RIVISTA

DI

PARASSITOLOGIA

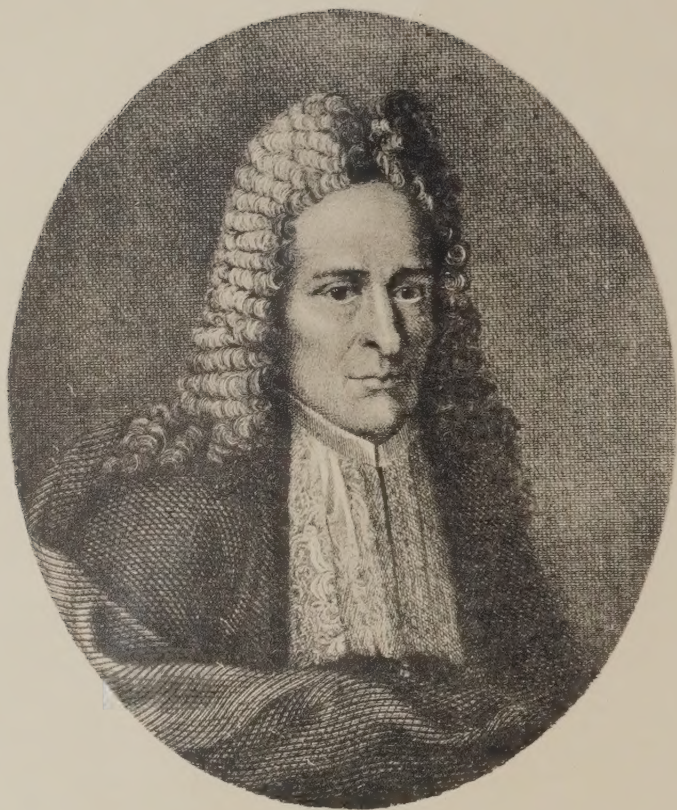
FONDATA DA A. MISSIROLI

PUBBLICAZIONE TRIMESTRALE



REDAZIONE E AMMINISTRAZIONE

ROMA - VIA ARNO, 5 - ROMA



Antonio Vallisneri

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 1 - Gennaio 1958

ANTONIO VALLISNERI

(1661 - 1730)

Dopo gli studi del Redi condotti nel sec. XVII « intorno agli animali viventi che vivono negli animali viventi », studi che venivano a porre le basi scientifiche e sperimentali della parassitologia in generale, nel successivo secolo XVIII questa branca della medicina ebbe notevole impulso per merito di alcuni che, se anche non si dedicarono esclusivamnte a questo genere di studi, pur tuttavia con indagini particolari contribuirono non poco alla conoscenza dei fenomeni patologici su base parassitaria.

Uno di questi scienziati fu Antonio Vallisneri (*).

Giustamente Egli può essere reputato il degno continuatore dell'opera di Francesco Redi poichè, contribuendo in maniera efficace alla spiegazione di alcuni fenomeni morbosi, rientra in quella schiera di menti eccelse che studiando la patologia degli esseri viventi, compreso l'uomo, nell'insieme delle loro manifestazioni biologiche, e , professando le dottrine mediche del tempo, lasciarono la propria impronta anche nel campo della patologia parassitaria.

Antonio Vallisneri nacque da nobile famiglia i cui ricordi si possono ritrovare fin dall'XI secolo. Famiglia di guerrieri e di magistrati ebbe probabilmente il dominio dell'Alta Vallisnera, nell'Appennino reggiano, da cui prese il nome. Nel 1600 la famiglia si stabilì a Scandiano, ma Antonio nacque a Tresilico, nel Granducato di Toscana, il 3 maggio 1661 da Lorenzo, Capitano di Ragione del Duca di Modena, e da Maria Davini.

Iniziò la sua educazione a Scandiano proseguendola poi con i Gesuiti a Modena e a Reggio. E' in questi primi anni che cominciò, si può dire, la sua formazione filosofico - scientifica. Portato a studiare gli antichi Maestri con i loro dogmi, specie di Aristotele, venne in contatto con tutte quelle nuove correnti della ricerca filosofica che, contro le vecchie teorie, insorgevano propugnando di allargare il campo delle cognizioni, adottando la ricerca e l'esperimento.

(*) Un suo figlio, pure medico, ebbe nome Antonio. Questi era uno dei quattro sopravvissuti ai 18 che videro la luce dalla sposa Laura Mattacodi. Gli altri morirono quasi tutti in tenera età.

Ma di Aristotele il giovanetto non si appagava. Più lo studiava e più lo trovava insufficiente, specialmente per quanto riguardava la fisica e le cose naturali, e anche perchè vi trovava quell'autorità che impone agli altri sottomissione. Ed Egli, che aveva profondo lo spirito d'indagine, non poteva ammettere limitazioni al proprio pensiero.

Il padre, conoscendo a fondo le sue tendenze, con esempio di liberalità non frequente a quei tempi, lasciò che il figlio scegliesse la Medicina. Presa, così, la decisione di dedicarsi alla Medicina, nel 1683 si recò a Bologna dove fu raccomandato a Marcello Malpighi. Si addottorò quindi a Reggio nel 1685, proseguendo i suoi studi di Medicina col Salani, mentre quelli di chirurgia con il Piela.

Nel dedicarsi alle scienze naturali, che prediligeva, frequentò molti illustri Maestri quali il Trionfetti nella Botanica e il Molinelli nella Chimica. Interessandosi di Anatomia fece importanti osservazioni che pubblicò in più lavori.

Dopo la morte del Sacchi ebbe la Cattedra di Medicina pratica a Padova, salendo alla quale, il 30 ottobre del 1700, pronunziò la celebre prolusione dal titolo « *studia recensiorum non evertunt veterum medicinam, sed confirmant* » ove rivelava tutta la sua timida prudenza di scienziato, nello stesso tempo affermando l'importanza degli studi *recentiorum* alla presenza di quegli ingegni per i quali aveva la massima stima e gratitudine.

Nel 1709 gli venne affidata la Cattedra seconda di Medicina Teorica resasi vacante per la morte di Alessandro Borromeo, mentre nel 1710, alla morte di Domenico Guglielmini, gli fu affidata la Cattedra Primaria di Medicina Teorica con la seguente motivazione che si può leggere nella lettera ducale di nomina: *In varie letture di Medicina fin qui esercitate, ha reso pieni saggi delle perfette cognizioni ch'Egli possiede dell'Arte, che con le dotte ed erudite stampe, co' libri ha fatto cospicuo il suo nome.*

La sua passione per l'insegnamento era tanta che invitava in casa propria gli scolari per renderli meglio persuasi, davanti ai pezzi anatomici, della verità delle proprie osservazioni. Spiegava, rispiegava, sacrificava tutto il tempo possibile per insegnare a scuola, in casa, negli ospedali. La pazienza era grande quanto la generosità del suo animo.

Esaminando il complesso delle opere del Vallisneri si nota un'impronta fondamentale nel campo delle scienze naturali, della biologia sopratutto, ma non bisogna trascurare il contributo di questo versatissimo scienziato lasciato alla medicina in genere.

La fama che ancor oggi circonda il nome di Antonio Vallisneri è principalmente dovuta all'aver intuita la natura parassitaria dei morbi infettivi e di essere quindi uno dei precursori delle moderne dottrine microbiche. In una lettera di risposta a Francesco Cogrossi precisava lucidamente i capisaldi della nuova dottrina, cioè la specificità degli agenti patogeni e la molteplicità della loro specie, la possibilità della loro virulentazione, la rapida moltiplicazione di

essi, l'esistenza di specie patogene per l'uomo e per gli animali, la diversità dell'azione da specie a specie.

Il Vallisneri è inoltre l'indagatore dei vermi. Egli chiedeva alla natura la rivelazione dei suoi segreti; ricchezza grande all'attività di uno scienziato quale Egli era, anche se scoperta nelle forme inferiori della vita. Ed era solito ricordare la sentenza di Plinio: *rerum natura nusquam magis quam in mini mis tota.*

Spesso tornava a questo suo preferito genere di ricerche soffermandosi volentieri a studiare la generazione dei vermi ordinari e di quelli del corpo umano, della loro origine dalle uova e descrivendone la struttura.

Conducendo *Osservazioni ed esperienze intorno alla ovaja, scoperta nei vermi tondi dell'uomo e dei vitelli,* descrive dettagliatamente e disegna, in due nitide tavole, l'ascaride dei vitelli e dell'uomo, nonchè l'anatomia dell'apparato riproduttore maschile e femminile dell'ascaride umano coll'uovo ingrandito. In tal modo viene a completare le ricerche sui vermi tondi iniziate dal Redi.

In *Osservazioni fisico-mediche* ecc., tratta, fra l'altro, di vermi nati dentro un uovo di lodola. In altra osservazione riferisce che nello sputo di un robusto contadino, affetto da pleurite verminosa, insieme a sangue, trovavansi piccoli vermi rotondi. Caso questo che il Vallisneri ci dice essere simile ad un altro osservato dal Santulliana.

Altre considerazioni ed esperienze sappiamo che fece *intorno alla generazione dei vermi ordinari del corpo umano* radunandole in un celebre lavoro ove l'A. prende le mosse dallo scritto dell'Andry, che allora aveva fatto gran rumore con le sue opere, e parla della necessità di studiare gli insetti prima di occuparsi dei veri vermi, per evitare quella confusione, che molti facevano, tra gli uni e gli altri ed ancora con altri corpi differenti.

Qui dichiara che tutti i vermi nascono dalle uova, che molti pretesi vermi sono invece larve di insetti, ed enumera i molti errori commessi da vari autori (Grandi, Redi, ecc.). Parla ancora delle condizioni di vita degli insetti e dei vermi, limitando il gruppo di questi ultimi. A chiusura dell'opera, in 48 soddisfacenti tavole, illustra le tenie e gli ascaridi, dandoci un lavoro di alta importanza scientifica.

Indagando, poi, del come la trasmissione delle uova dei vermi si facesse nel feto, stabilì che ciò avveniva attraverso il sangue, per le anastomosi vasali esistenti fra i vasi dell'utero e quelli della placenta.

Circa la trasmissione degli elminti espresse l'idea che la tenia non fosse un animale unico, ma vermi cucurbitini congiunti da sostanza gelatinosa, opinione che fu confermata anche da Giovanni Maria Lancisi, correggendo, così, gli errori dell'Andry sul verme solitario.

In zoologia ed epidemiologia illustrò l'*estro bovino* o *assillo.* Dallo studio dall'epidemia di afta epizootica del 1708-1709 e dalla lettura del lavoro del Lancisi *De bovilla peste,* si formò esatto il concetto del *contagium vivum,* teoria

già propugnata dal Fracastoro. Ciò fu oggetto di trattazione nelle sue *nuove osservazioni intorno alla costituzione verminosa ed epidemica seguita nelle cavalle, cavalli e puledri nel mantovano e di Venezia.* Qui si parla, inoltre di larve gastrofili rinvenute nel tubo digerente di questi animali e coglie l'occasione per trattare dei rimedi contro i vermi in generale distinguendo un metodo curativo ed uno preservativo, adottando a tal uopo, da buon terapeuta qual era, la cura con il mercurio dolce introdotto dal Boyle, a quel tempo ampiamente impiegato nel campo umano.

Il suo alto interesse alla ricerca lo spinse, con lucida intuizione, ad occuparsi dei *vermi delle galle,* malattia delle quercie, i quali, fino allora, si credeva nascessero spontaneamente.

Era questo della generazione spontanea uno dei secolari problemi che assillavano gli studiosi del tempo; Vallisneri lo affronta continuando gli studi del Redi, che, con suggestiva esperienza, aveva negato la generazione spontanea dei *vermi della carne,* i quali non erano altro che larve della mosca cornaria nate dalle uova depositate sulla carne stessa.

Per questa particolare affezione delle quercie, la questione era rimasta ancora insoluta. Il Vallisneri rivolge a questa la sua attenzione e ne fa oggetto di studio. Dopo ricerche pazienti e minuziose arrivò alla conclusione, e insieme scoperta, che il vermetto chiuso in quelle protuberanze (galle) non si originava spontaneamente, ma era la larva di un insetto che ivi aveva depositato le proprie uova.

La sua idea circa la natura parassitaria dei morbi trovò pratica dimostrazione anche nel campo della patologia umana con altrettante osservazioni così precise che ancora oggi hanno valore di attualità. Rivolgendo Egli, infatti, sempre più la sua attenzione alla propagazione dei *mali contagiosi,* descrive un'affezione comune a molti indigeni dell'Africa i quali, soggetti ad essere infestati, con intensi dolori, da certi *vermi sottili* negli arti inferiori sono soliti estrarli, poco alla volta, avvolgendoli ad un bastoncino di legno.

Amante del bello e del buono si dilettava raccogliere quanto di interessante e di curioso gli capitava sotto gli occhi. Nelle stanze della sua vasta abitazione aveva allestito a sue spese un cospicuo museo, ricco di oggetti anche rari, che utilizzava spesso come mezzo didattico di dimostrazione per i suoi allievi.

Studioso instancabile lasciò ai posteri una folta schiera di scritti di alto valore scientifico che il figlio Antonio, nel 1733, a Venezia per onorare la memoria del padre, pubblicò insieme ad alcuni altri rimasti inediti, con i tipi del Coletti in tre grossi volumi (*).

(*) *Opere fisico-mediche stampate e manoscritte dal Cavalier Antonio Vallisneri, raccolte dal suo figliolo Antonio, dedicate agli illustrissimi ed eccellentissimi Signori Riformatori dello Studio di Padova.* — In Venezia MDCCXXXIII, appresso Sebastiano Coletti.

Le più illustri Società e Accademie scientifiche d'Europa lo avevano voluto fra loro. Dal 1705 apparteneva alla Società Reale di Londra. Dal 1707 fu aggregato all'Accademia dei Curiosi della natura istituita a Vienna dal Montecuccoli. Firenze coniò in suo onore una medaglia, ponendovi come motto: *Tantum in modicis quantum in maximis.*

L'Imperatore Carlo VI, a cui aveva dedicato la sua grande opera sulla generazione degli uomini e degli animali, gli aveva donato una ricca collana d'oro con medaglione e gli aveva mandato un diploma con il quale lo nominava suo medico di camera. Rinaldo I, Duca di Modena, lo aveva fatto Cavaliere con trasmissibilità del titolo ai discendenti. Il Duca di Savoia lo aveva invitato a un posto cospicuo alla Università di Torino. Il Papa gli aveva offerto la carica di suo medico, dopo la morte dell'illustre Lancisi, carica che non volle ricoprire per non allontanarsi dalla sua famiglia che si trovava in Padova.

Medico altrettanto instancabile, scrupolosamente attaccato ai propri pazienti, era pronto ad accorrere ove il dovere esigeva la sua presenza. Il 12 gennaio del 1730, in un periodo in cui un'epidemia d'influenza infuriava in Padova, tornò a casa con un forte malessere febbrile. Credendo che il male dipendesse dallo stomaco per indigestione, volle curarsi da solo con dieta e acqua tiepida. Ma il 18 dello stesso mese, dopo una notte affannosa, capì che la malattia era molto grave e mandò a chiamare alcuni colleghi per un consulto. I colleghi lo visitarono e si fecero forza per confessargli che ormai era meglio pensare all'anima. E in quel giorno morì.

In questa ultima malattia fu assistito dal suo discepolo il Dott. Giambattista Mauri al quale dobbiamo una descrizione esattissima di essa.

Fu sepolto nella Chiesa degli Eremitani di Padova ove su di una parete si legge questa epigrafe:

D. O. M.
ANTONIO VALLISNERIO
ARTIS MEDICAE ASSERTORI EXIMIO
NATURALIS HISTORIAE AC PHIL.
RESTITUTORI CELEBERRIMO
SUMMIS HONORIBUS UNDEQUAUAE AUCTO
ANTONIUS FILIUS MOER. P.
OBIIT XV KAL. FEBR. ANNO SAL.
MDCCXXX AET. LXVIII MENS. VIII

LUIGI STROPPIANA
Incaricato di Storia della Medicina
nell'Università di Perugia

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 1 - Gennaio 1958

STUDI SULLA VIRULENZA DI *ENTAMOEBA HISTOLYTICA*

I. VARIAZIONI CICLICHE DELLA VIRULENZA DI UN CEPPO DI *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* NELL'INFEZIONE INTESTINALE DEL RATTO ALBINO IN SEGUITO A PASSAGGI SERIALI IN VITRO E NEL FEGATO DI *CRICETUS AURATUS*.

I. DE CARNERI (*)

Non tutti i ceppi di *E. histolytica* sono egualmente patogeni per l'uomo. Sull'interpretazione di questo fatto esiste una vecchia controversia, che negli ultimi anni è stata ripresa senza giungere a conclusioni definitive. BRUMPT (1925, 1949) ammette accanto alla forma « minuta » di *E. histolytica* l'esistenza di una *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925, morfologicamente indistinguibile ma non patogena, assai più diffusa della specie patogena soprattutto nelle regioni temperate: inoltre di *E. hartmanni* Prowazek, 1912, forma nana apatogena, la cui individualità è stata riconfermata dai recenti studi di BURROWS (1957).

REICHENOW (1953) e WESPHAL (1937), convinti dell'unicità della specie *E. histolytica,* ne sottolineano invece il carattere proteiforme e la grande variabilità sia dell'aspetto che della virulenza. Secondo questi autori, forme « minute » (6-20 μ) conducenti da lungo tempo una vita saprofitica nel lume intestinale, in certe circostanze possono penetrare nei tessuti, dove assumono la forma « magna » o « istolitica » (20-30 μ). Così, ceppi innocui per un portatore possono in un secondo tempo dimostrarsi virulenti verso lo stesso o verso altri ospiti.

FAUST (1954) e numerosi autori americani sostengono invece ancora oggi la posizione radicale che aveva assunto DOBELL nel primo dopoguerra: non esistono portatori sani, tutti i « passatori » di cisti amebiche tetranucleate sono degli ammalati evidenti o subclinici.

(*) *Istituto d'Igiene e Microbiologia dell'Università di Pavia* e *Istituto Carlo Erba per ricerche Terapeutiche, Laboratorio di Microbiologia, Milano,* (Direttore: Prof. L. CHECCACCI).

La questione è della massima importanza. Da un punto di vista sanitario si tratta di valutare l'amebiasi come una malattia che interessa diverse centinaia di milioni di persone, come risulterebbe dalla stima di GNEZDILOV (1947; vedi HOARE, 1950) o dai reperti parassitologici riportati da BELTRÀN (1948) e da ANDERSON e coll. (1953); oppure solo i pochi milioni in cui l'amebiasi è clinicamente evidente.

Vi è di conseguenza chi reputa necessario curare tutti i portatori (vedi ad es. MANSON - BAHR, 1956) e chi protesta contro l'amebafobia che si va diffondendo senza alcun serio motivo tra gli abitanti delle zone temperate i quali presentino un reperto coprologico positivo (vedi ADAMS, 1956).

Un aspetto del problema interessa anche la classificazione zoologica, e si inserisce nel problema più vasto delle relazioni che intercorrono tra le *Entamoebae* a cisti tetranucleate, assai diffuse tra i vertebrati e gli invertebrati, ed anche conducenti vita libera (vedi DE CARNERI, 1957b). Il classico criterio morfologico non è di grande ausilio nel chiarire la posizione tassonomica di questi microrganismi a struttura assai semplice, e si cerca ora di integrarlo con metodi citochimici, biochimici o sierologici, o in base a criteri fisiologici ed ecologici. BRUMP ritiene che si possano distinguere tra i protozoi delle specie sulla base della sola patogenicità, e cita il caso del *Trypanosoma rhodesiense* e del *T. brucei*. REICHENOW (1953, pag. 703), fa notare l'arbitrarietà di una distinzione specifica tra protozoi parassiti morfologicamente indistinguibili, quando non è possibile controllarne l'interfecondità. HOARE (1955) sostiene che la segregazione ecologica e le caratteristiche biologiche ereditarie di *E. ranarum*, *E. moshkorskii* ed *E. histolytica* giustificano la distinzione in tre *species* anche in assenza di differenze morfologiche; egli non ritiene che gli stessi principi possano essere invocati per separare da *E. histolytica* una *E. dispar* (1950); tuttavia (1949b, 1952c: vedi anche WOODRUFF 1956) egli ammette, accanto alla forma «minuta» di *E. histolytica*, potenzialmente patogena, l'esistenza di una razza geneticamente stabile, non patogena, con cisti da 7 - 8 μ, da chiamarsi *E. histolytica hartmanni*.

Negli ultimi anni alcuni studi sull'amebiasi sperimentale degli animali da laboratorio, intrapresi inizialmente per scopi pratici nel corso di ricerche di chemioterapia, hanno chiarito certi aspetti della biologia di *E. histolytica*. THOMPSON e coll. (1954) e NEAL e VINCENT (1956), confermando lavori precedenti di DESCHIENS (1941), CHANG (1945), MELENEY, FRYE e LEATHERS (1939) hanno dimostrato che dopo lunga coltivazione in vitro *E. histolytica* perde la capacità di superare la barriera dell'epitelio intestinale degli animali da laboratorio (nel caso specifico del ratto), e di invadere la submucosa e gli altri tessuti. Quando però questa barriera venga artificialmente superata, ad esempio iniettando le amebe nel fegato, esse si dimostrano ancora patogene, e possono inoltre riacquistare la capacità di invadere la parete intestinale.

Io ho riscontrato un analogo comportamento in un ceppo di *E. histolytica*

isolato dal Dr. J. F. Ryley nel maggio 1955 dalle cisti contenute nelle feci di un paziente di nome Meah, ricoverato presso la Liverpool School of Tropical Medicine.

Il ceppo conservò a lungo la sua alta patogenicità nell'infezione intestinale del ratto. Fino alla metà dell'agosto 1956, epoca in cui mi fu gentilmente spedito, era stato passato tre volte alla settimana in un terreno derivato da quello di Pavlova (1938) modificato da Jones (1946), simile a quello che descriverò più avanti. Per quattro volte fu indotto ad incistire in vitro, ed ogni volta la coltura fu ripresa dalle cisti. Il Dr. Ryley mi scrive che a tutt'oggi (Maggio 1957) il ramo del ceppo coltivato nel suo laboratorio si è mantenuto virulento.

Nei nostri laboratori il ceppo Meah fu conservato per passaggi bisettimanali. La sua patogenicità per il ratto iniziò presto a diminuire.

Nelle pagine che seguono si riporta la storia delle variazioni della patogenicità di questo ramo del ceppo, ed una dettagliata descrizione delle modalità di coltura e delle tecniche usate per provocare l'infezione amebica nell'intestini dei ratti albini e nel fegato degli hamster dorati.

Infezione endociecale nel ratto

Gruppi di ratti albini di una razza pura del nostro allevamento vengono slattati quando raggiungono un peso tra i 20 e i 30 g, e vengono nutriti per due giorni con una dieta simile a quella descritta da Taylor e coll. (1952): farina di mais intero, g. 330, farina di frumento intero, g 310; farina di pressatura di olio di lino, g 70; farina di alfalfa, g 20; estratto di fegato in polvere, g 30; latte intero in polvere, g 210; lievito secco, g 20; NaCl, g 5; $CaCO_3$, g 5. Si impasta il tutto con 300-400 cc d'acqua, e si confezionano delle palline consistenti, per impedire una dispersione del cibo. Ai rattini viene data anche acqua con vitamina C all'1 ‰, a volontà.

Il regime viene iniziato di solito a mezzogiorno di venerdì. Domenica alla stessa ora i rattini vengono posti a digiuno, con acqua e vitamina C.

Al mattino di sabato si preparano alcune bottiglie di Roux da 1 l contenenti 300 cc di un terreno simile a quello descritto da Pavlova (1938), della seguente composizione: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, g 1,61; KH_2PO_4; g 0,41; NaCl, g 7,3; estratto di lievito Difco, g 1; acqua dist., 1 l; pH 7,2. Si sterilizza per 30' ad una atmosfera, si aggiunge il 5% di siero di cavallo ed una traccia di polvere di riso sterilizzata per 1 ora a 150°. Ogni bottiglia viene seminata con 4 cc di una coltura di 48 ore di *E. histolytica* nello stesso terreno, e viene posta ad incubare a 37°C. Al mattino di lunedì il surnatante viene cautamente allontanato, e i 10-15 cc del sedimento vengono raccolti ed esaminati al microscopio. Le amebe devono essere più di 500.000 per cc; se necessario, si concentrano centrifugando a bassa velocità. Si aggiunge quindi una sospensione sterilizzata e neutralizzata di mucina Wilson 1701-W al 10%, fino ad avere una sospen-

sione di amebe e germi con mucina al 3%. Jones (1946) ha messo in evidenza che questa mucina aumenta la virulenza delle amebe nell'infezione intestinale del ratto.

I rattini digiuni da circa 20 ore vengono anestetizzati con etere; si disinfetta con alcool iodato l'addome, si opera una piccola incisione longitudinale senza particolari cautele di sterilità, ed usando una siringa da insulina ed un ago N. 1 si iniettano direttamente nel cieco da 0,5 a 0,6 cc di sospensione. L'ago non può avere un diametro inferiore, perchè la polvere di riso ancora presente tende ad intasarlo. Tavolta qualche po' del liquido fuoriesce dal cieco e contamina la cavità peritoneale. Si può evitare in gran parte questo inconveniente massaggiando opportunamente con garza il cieco appena l'ago viene estratto. Nella cavità peritoneale si fa cadere quindi una goccia di una soluzione contenente penicillina sodica 20.000 U/cc e diidrostreptomicina solfato 20.000 µg/cc. In precedenti lavori (de Carneri 1957 a, b) ho dimostrato che *E. histolytica* è insensibile al contatto prolungato di concentrazioni dello 0,5% del primo antibiotico e del 2% del secondo. Questa aggiunta diminuisce di molto la mortalità per peritonite causata dai batteri. L'incisione viene chiusa con 2-4 graffe Michel da 7,1/2 × 1,3/4 mm, si disinfetta esternamente con alcool iodato, e gli animali vengono tenuti per 4 giorni alla dieta già descritta, in gabbiette separate.

Dopo 96 ore dall'infezione i rattini vengono uccisi con vapori d'etere, il cieco viene prelevato, e si valuta l'entità dell'infezione e la virulenza delle amebe in base alla presenza di *E. histolytica* nel contenuto del cieco e di lesioni nelle pareti dello stesso, assegnando ad ogni animale un quoziente secondo il criterio seguente:

0 = nessuna ameba nelle feci del cieco e nella raschiatura della parete cecale; nessuna ulcerazione.

1 = da 1 a 20 amebe per vetrino preparato con feci del cieco opportunamente diluite con soluzione fisiologica ed esaminate al microscopio a 125 e, in caso di dubbio, a 500 ingrandimenti; nessuna ameba nella raschiatura della parete del cieco previamente lavata; nessuna ulcerazione.

2 = da 20 a numerosissime amebe per vetrino preparato dalle feci; nessuna ameba nella raschiatura della parete del cieco; nessuna ulcerazione.

3 = prescindendo dalla presenza o assenza di *E. histolytica* nelle feci del cieco, amebe sono presenti nella raschiatura della parete cecale; nessuna ulcerazione è macroscopicamente visibile. L'esperienza permette all'operatore, in base al numero delle amebe, al come sono raggruppate, al loro aspetto e alla presenza di globuli rossi fagocitati, di giudicare se le amebe provengono da microscopiche lesioni della parete intestinale.

4 = lesioni macroscopiche nella parete del cieco. L'esame microscopico a fresco deve confermare che si tratta di lesioni amebiche.

5 = più di metà del cieco ulcerata da gravissime lesioni amebiche.

E' da notare che *Entamoeba muris* è poco diffusa tra i ratti del nostro allevamento. D'altronde non è difficile per un osservatore esperto distinguere questa grossa ameba dai movimenti torpidi, simile ad *E. coli*, da *E. histolytica*.

I numeri dall'1 al 5 stanno ad indicare la infettività del ceppo di *E. histolytica*, dal 3 al 5 la capacità di invadere la parete intestinale («invasiveness» degli autori anglosassoni).

I quozienti relativi ai rattini appartenenti ad un dato gruppo vengono sommati e si calcola la media per ogni gruppo di animali. Quando il ceppo e l'età dei ratti usati non variano e le condizioni sperimentali restano costanti, queste medie danno un'idea della infettività e della patogenicità del ceppo di *E. histolytica*.

Infezione intraepatica nello hamster dorato

Si usano hamster dorati (*Cricetus auratus*) di circa 50 g di peso tenuti a regime normale. Altre specie animali (Reinertson e Thompson, 1951; Maegraith e Harinasuta, 1954; Sawada e Hara, 1954 a, b; Neal e Vincent, 1956) non sono altrettanto adatte allo scopo.

Sotto anestesia eterea si pratica una incisione trasversale all'altezza del fegato, e si iniettano, in condizioni simili a quelle già descritte per i ratti, da 0,05 a 0,1 cc di sospensione amebica nella parte dorsale del lobo epatico destro, provocando la formazione di una bolla omogenea, che traspare sotto la superficie.

Thompson e Reinertson (1951) immunizzano preventivamente gli animali contro i batteri presenti nelle colture di *E. histolytica*, per abbassare la mortalità dovuta ai batteri. Questa operazione è alquanto laboriosa. Io ho ottenuto lo stesso risultato evitando l'aggiunta di mucina, che aumenta la virulenza dei batteri, e mescolando alle sospensioni di amebe, circa mezz'ora prima dell'iniezione, 1000 U/cc di penicillina e 1000 μg/cc di diidrosptreptomicina. Altre 1000 U e 1000 μg vengono immessi nella cavità peritonale. Si chiude l'incisione con graffe Michel come con i ratti. Gli animali vengono conservati, senza attenzioni speciali, per tre giorni.

A 72 ore dall'iniezione gli hamster vengono uccisi con vapori d'etere, e il fegato viene asportato. Si isola la parte lesa, e si ricercano le amebe, spappolando l'ascesso in mortaio sterile con soluzione fisiologica e procedendo all'esame microscopico.

Nel corso di questo lavoro le amebe furono sempre ritrovate nelle lesioni epatiche. Spesso la lesione assume una forma ben delimitata di ascesso del peso di 100-600 mg. Qualche rara volta le lesioni presentano invece un aspetto granulare nel tessuto sano.

Nonostante il trattamento con antibiotici qualche batterio è sempre presente, come in assenza di questi antibiotici, anche Neal e Vincent nello

hamster (1956) e Bock e Mudrow - Reichenow nella cavia (1955) hanno messo in evidenza.

Per portare in coltura *E. histolytica*, che come è noto in vitro cresce solo in presenza di batteri, è sufficiente trasferire 0,1 cc di materiale in una provetta del terreno di coltura già descritto. I batteri presenti appartengono alle specie iniettate nel fegato assieme alle amebe, e si riadattano facilmente a crescere in vitro, permettendo un rapido recupero in coltura del ceppo di *E. histolytica*.

Si può per inciso far notare che difficoltà ben maggiori si incontrano quando si tenti di isolare *E. histolytica* dalle feci o dalle lesioni intestinali. Qui essa è associata ad una flora batterica «wild», che, portata in coltura, non sempre stabilisce nel terreno condizioni favorevoli alla crescita delle amebe. Neal e Vincent (1955) stimano necessari almeno 10 passaggi perchè si stabilisca un certo equilibrio tra i batteri e le amebe. Nell'intestino degli animali da laboratorio sono inoltre spesso presenti vari flagellati, sopratutto *Trichomonas muris*, che crescono più facilmente e rapidamente di *E. histolytica* nei terreni nutritivi, e che è assai difficile eliminare dalle colture. Questi flagellati si moltiplicano anche negli ascessi amebici epatici degli hamster, ed un mio tentativo di sbarazzarne un ceppo di *E. histolytica*, isolato da un'ulcera intestinale di un ratto, è stato abbandonato dopo quattro passaggi in vitro alternati a quattro iniezioni intraepatiche. E' a questo proposito da ricordare che *T. hominis* è stato trovato da Kessel (vedi Reichenow, 1953) in un ascesso amebico epatico. Westphal (1939) ha d'altronde dimostrato che *T. tenax T. hominis* e *T. vaginalis* sopravvivono negli ascessi batterici intramuscolari del ratto.

Il passaggio di un ceppo di *E. histolytica* dal fegato di uno hamster al fegato di un altro viene agevolmente conseguito anche senza passaggi intermedi in coltura, iniettando un po' del materiale prelevato da una lesione epatica, addizionato di penicillina e diidrostreptomicina, nel fegato di un nuovo animale. E' stato questo il metodo seguito nel corso del presente lavoro.

Diminuzione della « invasività » dopo coltivazione in vitro

Si riportano qui di seguito, in ordine progressivo, i singoli valori e le medie del livello di infezione del ceppo Meah nel ratto, dopo diverso tempo trascorso in coltura. A partire dal giorno dell'arrivo nel nostro laboratorio, e durante queste prime prove, il ceppo fu mantenuto in vitro mediante passaggi bisettimanali.

Giorni in coltura	Livello dell'infezione nei singoli ratti	media	Ratti infetti (da 1 a 5)	invasi (da 3 a 5)
11	4,4,5,1,5,5,5,5,	4,25	100%	88%
25	0,5,5,4,3,5,0,1,5,4,	3,2	80%	70%
39	0,4,0,5,5,4,4,	3,14	71%	71%
46	0,5,5,0,5,5,	3,33	67%	67%
60	1,2,2,2,4,3,4,	2,57	100%	43%
81	0,4,0,0,2,4,0,0,0,0,	1	30%	20%
88	2,4,2,5,0,0,3,5,0,	2,33	67%	44%
95	1,2,0,3,2,1,2,1,2,0,1,3,	1,5	83%	17%
102	4,0,0,2,0,0,1,2,2,1,	1,2	60%	10%

Si nota una progressiva diminuzione del livello medio d'infezione, dovuta sia alla diminuzione della percentuale di ratti ulcerati (dall'88% iniziale al 10% tra quelli iniettati dopo 102 giorni) sia alla diminuzione della gravità delle singole lesioni. A questo punto, avendo il ceppo Meah praticamente perso la sua virulenza verso il ratto, fu iniziata una serie di passaggi nel fegato degli hamster. Gli animali furono uccisi dopo 3 o 4 giorni dall'infezione, e il passaggio da animale ad animale fu eseguito due volte alla settimana. Da ogni lesione epatica si allestirono prudenzialmente anche delle colture, che, una volta accertata l'infezione dello hamster successivo, venivano abbandonate. Dopo 4 passaggi nel fegato le amebe furono isolate e, dopo un passaggio in provetta, vennero seminate in bottiglie di Roux, ed iniettate nel cieco di un gruppo di rattini. I risultati furono i seguenti: Meah 4, da 7 giorni in coltura, = 3,1,0,5,3,1,2,0,4,3,4,0,0, media = 1,63; infetti = 69%; invasi = 46%.

La percentuale di ratti con lesioni amebiche di varia gravità nel cieco risulta aumentata al 46%. Tuttavia, a causa della bassa percentuale di animali infetti (69%), la media del livello d'infezione è di poco superiore a quella di partenza. Un altro lotto di rattini fu infettato dopo altri sette giorni di coltura con i seguenti risultati: Meah, da 14 giorni in coltura, = 0,0,3,0,0,0,4,1,0, 4,1,2,2, media = 1,3; infetti = 54%; invasi = 23%.

Di fronte a questi risultati, dopo 18 giorni di coltura in vitro, il ceppo Meah fu di nuovo passato nel fegato di hamster, per altre 9 volte: in totale 13 passaggi. Durante tutto questo periodo le lesioni epatiche furono sempre più o meno della stessa gravità, senza che il ceppo mostrasse in questa sede un aumento di virulenza. Non è stata però tentata a questo proposito una valutazione quantitativa. Le amebe provenienti dal 13° hamster furono portate in coltura, e ivi mantenute mediante passaggi trisettimanali. L'andamento della patogenicità del ceppo Meah 13 sul ratto dal momento in cui esso venne isolato è stato il seguente:

Giorni in coltura	Livello dell'infezione nei singoli ratti	media	Ratti infetti (da 1 a 5)	invasi (da 3 a 5)
7	5,5,5,5,5,5,3,5,5,4,5,2,5,4,2,3	4,25	100%	88%
21	3,4,2,0,5,2,4,5,4,4,	3,3	90%	70%
35	5,1,0,5,0,0,2,4,0,4,4,	2,27	64%	45%
56	4,4,0,0,3,3,0,0,	1,75	50%	50%

A questo punto partendo da un singolo trofozoita isolato al 61° giorno di coltura fu allestita una coltura clonale, che si rivelò leggermente più patogena verso il ratto, con livello medio d'infezione = 2,33; infetti = 67%; invasi = 60%. Da uno dei ratti con grado d'infezione = 4 il ceppo fu passato direttamente nel fegato di un hamster, quindi in coltura; di nuovo fu iniettato nel cieco di un gruppo di ratti, ottenendo un livello medio d'infezione = 3,13; infetti = 87%; invasi = 73%. La flora batterica che accompagnava le amebe in coltura dopo il passaggio nel cieco del ratto, pur permettendo la conservazione del ceppo negli altri terreni, non favoriva però una crescita abbondante dei trofozoiti nel terreno di Pavlova usato per la produzione in forte quantità in occasione delle infezioni. Questo ramo del ceppo fu perciò abbandonato.

Agli inizi del novembre 1957, cioè a distanza di un anno dal momento in cui il ramo originario del ceppo Meah aveva perso la virulenza, esso, che era stato sempre conservato per passaggi bisettimanali in terreno di Pavlova, diede in un gruppo di ratti i seguenti risultati: 0,0,2,0,1,0,0,0,1,0. Media = 0,4; infetti = 30%. Dalla coltura i trofozoiti furono allora passati nel fegato di una serie di 5 hamster. Riportati in coltura, furono iniettati nel cieco di 10 ratti, con i seguenti risultati: 5,5,4,4,1,4,5,5,4,3. Media = 4; infetti = 100%; invasi = 90%. Così questo ceppo dimostra di possedere una potenziale patogenicità anche dopo un anno di avirulenza indotta da un genere saprofitico di vita.

Discussione e conclusioni

Dall'insieme di questi dati si può concludere che sia la percentuale dei ratti colpiti da lesioni macroscopiche o microscopiche nella parete del cieco, sia la gravità di queste lesioni diminuiscono regolarmente con l'aumentare del numero delle generazioni di *E. histolytica* in coltura.

Anche la percentuale dei ratti comunque infetti diminuisce, ma non altrettanto regolarmente. Si può notare che, quando il ceppo è ancora invasivo, le amebe, appena iniettate nel cieco, si trovano in un ambiente condizionato dalla flora batterica dell'intestino, che non sempre è adatta a permettere la crescita di *E. histolytica* e dei batteri che l'accompagnano. I trofozoiti hanno però occasione di entrare in contatto con la mucosa intestinale, e grazie ad un fattore di penetrazione, riescono rapidamente a superarla e a stabilirsi nella submucosa, moltiplicandosi poi a spese dei tessuti. Questa capacità delle amebe «invasive» si sottrarsi all'ambiente non sempre favorevole del lume intestinale spiega la forte percentuale iniziale di animali comunque infetti. Infatti ho notato che numerosi ratti con vaste ulcerazioni piene di amebe nella parete intestinale non hanno amebe nelle feci del cieco.

Più che al tempo trascorso in coltura, questa perdita di invasività è legata al numero di generazioni succedutesi dal momento in cui *E. histolytica* è

stata portata in coltura. Il ceppo Meah è stato infatti passato in vitro due volte alla settimana; il ceppo derivato Meah 13 è stato passato 3 volte alla settimana, perchè temevo che lasciando trascorrere 4 giorni prima di operare il trapianto si favorisse una selezione, nella popolazione amebica, degli eventuali biotipi a più lento sviluppo, con conseguente eliminazione dalle colture di quelli a metabolismo più rapido, presumibilmente più virulenti, i cui trofozoiti dopo 4 giorni a 37° sono in gran parte già morti. Invece l'invasività diminuì più rapidamente in Meah 13 che non in Meah.

Questi dati concordano con quelli di NEAL (1954) il quale conclude che provocando di quando in quando l'incistazione in vitro, ed alternando alla coltivazione dei trofozoiti lunghi periodi di conservazione delle cisti al freddo, si riesce se non ad impedire, almeno a rallentare lo scadimento delle capacità invasive di *E. histolytica.*

La velocità con cui questo parassita perde la invasività in seguito a passaggi in vitro è assai diversa da ceppo a ceppo. NEAL e VINCENT (1956) hanno coltivato per 5 anni il ceppo M senza notare diminuzione della patogenicità verso il ratto; nei 29 mesi che seguirono essa lentamente declinò. THOMPSON e coll. (1954) che operano in condizioni assai simili alle nostre, trovano che il ceppo 200 perde 1 unità del livello medio d'infezione ogni 9 mesi.

Il nostro ceppo Meah è invece caratterizzato da una alta velocità di inattivazione, avendo perso circa 3 unità in 3 mesi. I ceppi derivati Meah 4 e Meah 13 hanno perso ancor più rapidamente la invasività riacquistata per passaggio nel fegato di hamster: l'ultimo in un mese ha perso due unità.

Invece tra i ceppi derivati dal succitato ceppo M, uno perdette la invasività dopo 40 settimane, ed altri tre la conservavano ancora dopo un anno.

Alla diminuzione della patogenicità per la parete intestinale non corrisponde nel ceppo Meah una diminuzione della patogenicità per il fegato. Questo metodo di restituzione delle proprietà invasive si basa appunto sul fatto che molti ceppi conservano la loro patogenicità per il tessuto epatico.

Non sempre però il passaggio nel fegato conferisce ad *E. histolytica* proprietà invasive per l'intestino. NEAL e VINCENT (1956) hanno trovato che due ceppi (EA e JO) provenienti da individui asintomatici, e rivelatisi non invasivi per il ratto, sono ancora patogeni per il fegato dello hamster, ma restano apatogeni per il ratto anche dopo numerosi passaggi intraepatici.

Altri 3 ceppi non invasivi, provenienti da individui asintomatici, si rivelarono apatogeni anche nel fegato.

E' interessante notare che, secondo gli stessi autori, un ceppo RD, inizialmente invasivo, perde' in vitro la sua patogenicità non solo per l'intestino del ratto, ma praticamente anche per il fegato dello hamster; ignorando la sua storia precedente, un parassitologo che condividesse le idee di BRUMPT lo considererebbe un tipico esempio di *E. dispar.*

Sarebbe molto interessante confermare questo dato, protraendo per anni la coltivazione in vitro di altri ceppi che abbiano perso la primitiva invasività, per controllare se la patogenicità possa sempre essere riacquistata; o se alla lunga la loro involuzione non divenga duratura: « Dauermodifikation », che secondo HOARE (1952b) prelude nei protozoi alla differenziazione in razze.

E' stato dimostrato ad esempio che *T. rhodesiense*, il quale si differenzia da *T. brucei* solo per la sua patogenicità verso l'uomo, la perde dopo prolungati passaggi nel topo (FAIRBAIRN, 1956).

La diminuzione della patogenicità in coltura può prestarsi a qualche considerazione sulla sorte di *E. histolytica* nei portatori sani. REICHENOW (1931), WESTPHAL (1938b), HOARE (1952a, c, 1949a), MORTON e coll. (1951) e numerosi altri autori hanno messo in evidenza che *E. histolytica* può vivere come commensale nel lume intestinale, nutrendosi di batteri. Anche ANDERSON, BOSTICK e JOHNSTONE (1953), i quali nel complesso condividono il parere di FAUST secondo cui nei portatori asintomatici *E. histolytica* vive in microscopiche ulcerazioni della mucosa intestinale, continuamente riparate dalla reazione dell'organismo, ammettono (pag. 102) che individui naturalmente resistenti respingano l'invasione amebica, costringendo i trofozoiti a sopravvivere come commensali nel lume intestinale. Le loro condizioni di vita in questo ambiente sono assai simili a quelle delle amebe in coltura, e le generazioni che si susseguono saranno soggette allo stesso scadimento delle proprietà invasive che si verifica in vitro. ROGOVA (1956) ha dimostrato che ceppi isolati da portatori sani sono meno patogeni per gli animali da laboratorio che non ceppi isolati da dissenterici o da convalescenti.

Qualora l'infezione del lume intestinale di individui naturalmente resistenti perdurasse tanto a lungo da permettere una evoluzione irreversibile, questi individui potrebbero fungere da diffusori di ceppi di *E. histolytica* resi stabilmente apatogeni. WESTPHAL (1937 a) ha dimostrato, autoinfettandosi con cisti provenienti da un convalescente, che dopo otto mesi di decorso asintomatico una infezione amebica può ancora trasformarsi in dissenteria amebica grazie all'azione concomitante di una flora batterica patogena. Tuttavia non è accertato che questo autore fosse resistente nel senso inteso da ANDERSON e coll., e che nel periodo asintomatico egli fosse del tutto immune da lesioni micriscopiche. D'altro canto si è già visto che la velocità con cui *E. histolytica* perde in vitro la virulenza varia grandemente da ceppo a ceppo.

Anche l'esistenza di razze geografiche di *E. histolytica* diversamente patogene potrebbe trovare una spiegazione. Secondo GNEZDILOV (1947; vedi HOARE, 1952 c) in certe regioni dell'Asia centrale tra sofferenti di dissenteria amebica ed individui infetti asintomatici vi è un rapporto di 1:4; secondo WESTPHAL (1948) in Nord Africa, durante l'ultimo conflitto, v'era un rapporto di 1:80; a San Domingo (1949) di 1:300; infine, secondo HOARE (1950, 1952 c) in Inghilterra tale rapporto si avvicina ad 1:100.000. Secondo lo stesso autore, e secondo

WESTPHAL (1937 b), SLUITER (1948), ADAMS e SEATON (1949), la maggioranza dei rari casi di dissenteria amebica nell'Europa centro - settentrionale è dovuta a ceppi esotici di *E. histolytica*. La diversa suscettibilità di varie razze umane alla dissenteria amebica dipende anche dalle diverse abitudini alimentari, come ha messo in evidenza ELSDON - DEW (1956) in Sud Africa. E' quindi prevedibile che tra una popolazione umana caratterizzata da un particolare regime alimentare e da una forte percentuale di individui naturalmente resistenti prendano origine e si diffondano ceppi di *E. histolytica* sempre meno virulenti.

Dopo la scomparsa di BRUMPT, l'esistenza di *E. dispar* come specie distinta non ha più sostenitori. Anche SIMIC, i cui studi portarono un contributo fondamentale alla teoria dell'esistenza di ceppi stabilmente apatogeni (cfr. BRUMPT, 1949, p. 220), ci confidava recentemente di essere ora dell'opinione che, a parte *E. hartmanni*, tutti i ceppi non virulenti conservino una potenziale patogenicità, rivelabile in circostanze magari eccezionali.

E' indubbio che *E. histolytica* dimostra per varie vie di essere un protozoo dotato di particolare «elasticità» morfologica e fisiologica. Tuttavia i sopraricordati rilievi epidemiologici consigliano di tener presente la possibilità di una mutazione che privi certi ceppi di *E. histolytica* della capacità di superare la barriera dell'epitelio intestinale. Secondo WESTPHAL (1938 a) la patogenicità di questo protozoo è essenzialmente legata alla secrezione di enzimi proteolitici che sciolgono le cellule dei tessuti invasi; in questa fase *E. histolytica* si procura il nutrimento per digestione extra-cellulare, e lo assume per osmosi. Nel lume intestinale, e in coltura, essa invece si nutre fagocitando batteri e particelle d'amido, con digestione intracellulare. Già DOBELL e LAIDLAW (1928) avevano notato che *E. histolytica* in coltura perde rapidamente la propria virulenza quando può nutrirsi ingerendo amido di riso. La perdita della virulenza sarebbe perciò legata all'assuefazione ad un tipo intracellulare di digestione, e alla mancata secrezione di particolari enzimi proteolitici nell'ambiente esterno; si potrebbe parlare di una perdita stabile della patogenicità quando *E. histolytica* perdesse la capacità di sintetizzare questi enzimi.

E' certo che la questione è ancora ben lontana dall'essere chiarita. Una risposta a questi problemi potrà essere data solo insistendo nello studio della sua vita di parassita, indagando la sua fisiologia in coltura, possibilmente in assenza di batteri, e confrontando con metodi biochimici e istochimici la composizione ed il metabolismo di rami virulenti e avirulenti derivati da uno stesso ceppo.

RIASSUNTO

La capacità di un ceppo di *E. histolytica* di invadere la parete intestinale del ratto diminuì gradualmente col susseguirsi delle generazioni di trofozoiti in vitro. Il ceppo riacquistò la virulenza dopo 13 passaggi nel fegato di *Cricetus auratus* e la perdette ancora dopo una serie di passaggi in vitro. Dopo un anno un ramo avirulento del ceppo fu di nuovo passato nel fegato dello hamster dorato e ancora una volta *E. histolytica* riacquistò la virulenza verso l'intestino del ratto. Si discute il significato di questo comportamento in relazione all'epidemiologia dell'amebiasi umana, considerando analoghe le condizioni di sviluppo della forma «minuta» di *E. histolytica* in vitro e nel lume intestinale di individui naturalmente resistenti.

SUMMARY

A strain of *E. histolytica* isolated in May 1955 was kept in a laboratory for over a year, subculturing thrice-weekly in monophasic medium containing 5% horse serum and 0,1% yeast extract in phosphate buffer at pH 7,2, with the addition of rice starch. During this period it was made to encyst four times, in vitro. Its pathogenicity in intestinal amebiasis of young albino rats remained extremely high. In August 1956 a line of the strain was transferred to our laboratories, where it was kept on the same medium, subculturing twice weekly. The pathogenicity for rats gradually diminished passing from an Average Degree of Infection of 4,25 (max. = 5) to 1, 2 in 3 months. For this reason a series of passages in the liver of hamsters was carried out. After 4 passages the A.D.I. in the rat rose to 1,63 and after 13 passages had returned to 4,25. The virulent strain was then manteined in vitro, subculturing thriceweekly. The speed of inactivation increased and the A.D.I. gradually changed from 4,25 to 1,75 in about 50 days.

The strain first losing its invasive properties was kept for a year on Pavlova's medium. After this time the virulence towards rat coecum was restored by passage through 5 hamsters'livers, obtaining an A.D.I. of 4.

It is concluded that the virulence towards the intestinal walls is a property which is gradually lost with the passage of the generations of *E. histolytica* kept in cultures. The case is quoted of a virulent strain which on prolonged cultivation lost even its pathogenicity towards the liver of hamsters, as reported in the literature on this subject.

Considering the conditions of culture as analogous with those occurring during infection of the intestinal lumen, the hypothesis is put forward that the amebae lose their virulence also in these conditions. It is thought probable that in a human population on an unfavourable diet as regards invasiveness of amebae, and characterized by a high percentage of naturally resistant individuals, the strains of *E. histolytica* become increasingly less invasive. It is possible that at a certain stage these modifications become irreversible and give rize to apathogenic strains of *E. histolytica*. In order to confirm this hypothesis it is considered necessary to prolong over a number of years the in vitro cultivation of numerous strains of *E. histolytica* which have lost their primitive invasiveness, in order to check whether or not this can be always reacquired.

BIBLIOGRAFIA

Adams A. R. D. (1956): Treatment of intestinal amoebiasis, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *50*, 109-113.

Adams A. R. D., Seaton D. R. (1949): Amoebiasis in England as a household disease, *Brit. Med. J.*, *2*, 136.

Anderson H. H., Bostick L., Johstone H. G. (1953): Amebiasis-Pathology, Diagnosis and Chemotherapy. Charles C. Thomas publisher, Springfield-Ill. (U.S.A.).

BELTRÀN E. (1948): Epidemiologia de las infecciones con *Endamoeba histolytica*. Sect. VIII, Protozoan diseases, *Proc. 4th. Internat. Cong. on Trop. Med. & Malaria, Washington 2*, 1056.

BOCK M., MUDROW-REICHENOW L. (1955): Experimentelle Untersuchungen über *Entamoeba histolytica, Z. Tropenmend. Parasitol., 6*, 344-347.

BRUMPT E. (1925): Etude sommaire de l'« *Entamoeba dispar* » n.sp., amibe a kystes quadrinucléés parasite de l'homme, *Bull. Acad. Méd., 94*, 943-952.

BRUMPT E. (1949): Précis de Parasitologie, 6ª ed., Masson et C.ie, Parigi.

BURROWS R. B. (1957): *Endamoeba hartmanni. Am. J. Hyg., 165*, 172-188.

DE CARNERI I. (1957): The « in vitro » sensitivity of four strains of *Entamoeba histolytica* after various periods of incubation, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, in corso di stampa.

DE CARNERI I. (1957b): *Entamoeba invadens* Rodhain, 1934, ed *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903; studio comparato della sensibilità in vitro a 16 farmaci, e problemi connessi con l'uso della prima come modello per ricerche di chemioterapia dell'amebiasi, *Riv. di Parassitologia, XVIII*, 133-153.

CHANG S. L. (1945): Studies on *Entamoeba histolytica*. V. On the decrease in infectivity and pathogenicity for kittens of *E. histolytica* during prolonged in vitro cultivation and restoration of these characters following encystment and direct animal passage, *J. infect. Dis. 76*, 126.

DESCHIENS R. (1941): Nouvelles données sur la relation existant entre l'enkystement et la conservation du pouvoir pathogène des amibes dysentériques, en culture, *Ann. Inst. Pasteur, 67*, 468-470.

DOBELL C., LAIDLAW P. P. (1926): On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoebae, *Parasitology, 18*, 283-318.

ELSDON-DEW R. (1956): Further aspects of amoebiasis in Africans, *Centr. Afr. J. Med., 2*, 291-294.

FAIRBAIRN H. (1956): The infectivity to man of syringe-passaged strains of *Trypanosoma rhodesiense* and *T. gambiense, Ann. Trop. Med. Parasitol., 50*, 167-171.

FAUST E. C. (1954): *Amebiasis*, Charles C. Thomas, Springfield, Ill., U.S.A.

GNEZDILOV V. G. (1947): Distribuzione geografica, epidemiologia e profilassi dell'amebiasi, *Med. Parasitol.*, Mosca, *16*, 13-32 (in russo).

HOARE C. A. (1949): The food habits of *Entamoeba histolytica, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 43*, 7.

HOARE C. A. (1949b): Handbook of Medical Protozoology. Baillière, Tindall & Cox, London.

HOARE C. A. (1950): Amoebiasis in Great Britain, with special reference to carriers. *Brit. Med. J., 2*, 238-241.

HOARE C. A. (1952a): The food habits of *Entamoeba histolytica* in its commensal phase, *Parasitology, 42*, 43-47.

HOARE C. A. (1952b): The taxonomic status of biological races in parasitic protozoa, *Proc. Linn. Soc. London*, Sess. 163, Pt. 1, 44.

HOARE C. A. (1952c): The commensal phase of *Entamoeba histolytica, Exper. Parasitol., 1*, 411-427.

HOARE C. A. (1955): Intraspecific biological groups in pathogenic protozoa, *Refuah Veterinarith, 12*, 263-258.

JONES W. R. (1946): The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica;* with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds, *Ann. Trop. Med., 40*, 130-140.

MAEGRAITH B. G., HARINASUTA C. (1954): Experimental amoebic infection of the liver in guinea-pigs, *Ann. Trop. Med. Parasitol. 48*, 421-433.

MANSON-BAHR P. (1956): Symposium on the treatment of human amoebiasis: discussion, *Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg., 50*, 129-130.

MENELEY H. E., FRYE W. W., LEATHERS W. S. (1939): The effect of prolonged cultivation on the pathogenicity of various strains of *Endamoeba histolytica* for kittens, *Amer. J. Hyg.*, *29*, 61.

MORTON T. C., NEAL R. A., SAGE M. (1951): Indigenous amoebiasis in Britain, *Lancet*, *260*, 766-769.

NEAL R. A. (1954): The influence of encystation upon the virulence of *Entamoeba histolytica* to rats, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *48*, 533-536.

NEAL R. A., VINCENT P. (1955): Strain variation in *Entamoeba histolitica*. I. Correlation of invasiveness in rats with the clinical history and treatment of the experimental infections, *Parasitology*, *45*, 152-162.

NEAL R. A., VINCENT P., (1956): Strain variation in *Entamoeba histolytica*. II. The effect of serial liver passage on the virulence, *Parasitology*, *46*, 173-182.

PAVLOVA E. A. (1938): Sur les méthodes de la culture d'*Entamoeba histolytica*, *Med. Parasit. & Parasitic. Dis.* Mosca, 7, 244. (in russo: riass. in francese a pag. 277). Riassunto in *Trop. Dis. Bull.* 1939. *36*, 286

REICHENOW E. (1931): Die pathogenetische Bedeutung der Darmprotozoen des Menschen. *Zentr. Bakt.* Abt. I Orig., *122*, 195-212.

REICHENOW E., in: DOFLEIN F.+, REICHENOW E. (1953): Lehrbuch der Protozoenkunde, sesta edizione, Jena.

REINERTSON J. W., THOMPSON P. E. (1951): Experimental amebic hepatitis in hamsters, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, *76*, 518-521.

ROGOVA L. I. (1956): Pathogenicity of strains of dysentery amoeba recovered from healthy carriers, *Med. Parasit. & Parasitic. Dis.* Mosca, *25*, 330-335 (in russo).

SAWADA T., HARA K. (1954): Studies on the production of amebic liver abscess. I. Experimental production of liver abscess in cats, *Gunma J. Med. Sci.*, *3*, 169-179.

SAWADA T., HARA K. (1954): Studies on the production of amebic liver abscess II. Experimental production of liver abscess in rabbits and dogs, *Gunma J. Med. Sci.*, *3*, 181-193.

SLUITER C. P. (1948): De Dierlijke Parasieten van den Mensch, 5th ed. Amsterdam.

TAYLOR D. J., GREENBERG J., JOSEPHSON E. S. (1952): The effect of two different diets on experimental amebiasis in the guinea pig and in the rat, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *1*, 559-566.

THOMPSON P. E., MCCARTHY D., REINERTOSON J. W. (1954): Observations on the virulence of *Endamoeba histolytica* during prolonged subcultivation, *Am. J. Hyg.*, *59*, 249-261.

WESTPHAL A. (1937a): Betrachtungen und experimentelle Untersuchungen zur Vilulenz der *Entamoeba histolytica* beim Menschen, *Arch. Schiffs. -u. Tropen-Hyg.*, *41*, 262-279.

WEESTPHAL A. (1937b): Zur Grossen-Variabilität der *Entamoeba histolytica*, *Festschr. Nocht*, J. J. Augustin, Hamburg, 662-669.

WESTPHAL A. (1938a): Die Pathogenese der Amöbenruhr bei Mensch und Tier. I. Das Wesen der pathogenetischen Wirksamkeit der Ruhramöbe, *Arch. Schiffs-u. Tropenhig.* *42*, 343-349.

WESTPHAL A. (1938b): Die Pathogenese der Amöbenruhr bei Mensch und Tier. II. Die Pathogenese der Amöbenruhr beim Menschen, *Arch. Schiffs.-u. Tropen-Hyg.*, *42*, 441-459.

WESTPHAL A. (1939): Protozoen der offenen Körperhöhlen des Menschen in experimentellen Abszessen, *Z. Bakt Abt. I Orig.*, *144*, 416-421.

WESTPHAL A. (1948): Zur Epidemiologie und Pathogenese der Amöbenruhr in Nordafrika 1941/42, *Z. Hyg.*, *128*, 73-86.

WESTPHAL A. (1949): Amöbenruhr auf Santo Domingo, *Z. Tropenmed. Parasitol.*, *1*, 225-230.

WOODRUFF A. W. (1956): Symposium on the treatment of human amoebiasis. Discussion, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *50*, 136-138.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 1 - Gennaio 1958

AZIONE DELLA SPLENECTOMIA NELL'INFEZIONE DA *PLASMODIUM ROUXI* NEI CANARINI

A. CORRADETTI e F. VEROLINI (*)

Il *Plasmodium rouxi* fu descritto per la prima volta da EDM. ed ET. SERGENT e A. CATANEI (1) (2) (3) (4) in passeri dell'Algeria.

Oltre alle particolari caratteristiche morfologiche (schizonti piccoli situati presso un polo dell'eritrocita, merozoiti in numero di quattro, gametociti allungati), questo plasmodio ha la peculiarità di produrre un'infezione continuata, che dura in genere tutta la vita con una parassitemia sempre molto bassa per cui non è agevole distinguere un vero e proprio attacco primario.

Appariva di grande interesse determinare se questo particolare tipo di decorso potesse venire influenzato, come avviene per altri plasmodi aviari, dall'ablazione della milza.

Pertanto abbiamo istituito i presenti esperimenti diretti a studiare il comportamento di canarini infettati con *P. rouxi* ai quali si asportava la milza in differenti momenti del decorso naturale dell'infezione.

Ad un primo gruppo di canarini abbiamo asportato la milza durante l'infezione e ne abbiamo confrontato il decorso con quello che si verificava spontaneamente in canarini non splenectomizzati.

In un secondo gruppo abbiamo fatto precedere alla inoculazione la splenectomia allo scopo di studiarne gli effetti sul periodo di incubazione dell'infezione e nel successivo decorso.

MATERIALE E TECNICA

Il ceppo di *Plasmodium rouxi* del quale ci siamo serviti per le nostre osservazioni ci è stato inviato, per la cortesia del PROF. P. C. GARNHAM, dalla London School of Tropical Medicine and Hygiene.

Esso è stato mantenuto in laboratorio attraverso passaggi in serie in canarini mediante inoculazione di sangue nella massa dei muscoli pettorali.

L'asportazione della milza ai canarini è una operazione che comporta una mortalità (durante l'atto operatorio o subito dopo) di circa il 75 per cento.

(*) *Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Parassitologia, Roma.*

La milza dei canarini è costituita da un organo di forma allungata, cilindrico, il quale è situato profondamente, dietro lo stomaco, disposto dall'alto in basso, dall'indietro in avanti e da sinistra verso destra.

La nutrizione è assicurata da 3-4 rami arteriosi che penetrano nell'organo in punti che sono disposti lungo una linea longitudinale, corrispondente all'asse maggiore dello organo stesso.

Un foglietto fibroso riveste completamente la milza ed i suoi vasi nutritivi, formando, in corrispondenza di questi ultimi, una specie di meso il quale costituisce anche un mezzo di fissazione della milza alla parete posteriore del cavo addominale; questa formazione che può essere considerata il peduncolo della milza, si presenta pertanto sottile ed estesa per quasi tutta la lunghezza dell'organo.

Per effettuare l'operazione abbiamo praticato una piccola incisione della cute, in corrispondenza della proiezione sulla stessa della grande curvatura dello stomaco che si vede per trasparenza.

Messa allo scoperto la cavità addominale, e dopo aver inciso una sottile formazione fibrosa che dallo stomaco passa sull'intestino, si introduce un divaricatore sotto lo stomaco e si tira questo in alto e verso destra; rimane in tal modo libera all'accesso una cavità situata dietro lo stomaco, e nella parete dorsale della quale è fissata la milza.

Tenendo sempre sollevato lo stomaco in alto e a destra (come divaricatori ci siamo serviti di spatole di Wecker), si isola la milza dalle anse intestinali e si procede alla legatura del peduncolo.

Mentre il polo anteriore-inferiore è facilmente accessibile, è necessario trarre in basso ed in avanti, con un'ansa di Weber, il polo postero-superiore, situato molto profondamente.

Si circonda quindi il peduncolo con catgut n. 0 e si effettua la legatura; è questo il momento più delicato dell'operazione in quanto essendo il peduncolo corto ed avendo una base di impianto allungata è facile provocare la lacerazione dei vasi lienali e dei contigui vasi mesenterici, durante il tentativo di legatura.

Effettuata la legatura, si incide longitudinalmente la capsula della milza con un piccolo bisturi da cataratta e si asporta l'intera polpa raschiandola dalla superficie interna della capsula on una piccola curetta.

Questa manualità si è dimostrata meno pericolosa della recisione della milza dal suo peduncolo legato, operazione nella quale è facile provocare con il bisturi o con le forbici la rottura dei vasi mesenterici situati dietro la milza.

Esperimenti e loro risultati

Le nostre ricerche sono state eseguite su 36 canarini di 8 - 12 mesi di età, così ripartiti:

a) In 18 canarini si è lasciata decorrere l'infezione spontaneamente.

b) In 10 canarini si è effettuata la splenectomia in vari momenti del l'infezione.

c) In altri 8 canarini si è prima praticata la splenectomia e si è quindi indotta l'infezione.

Osservazioni sull'incubazione e sul decorso spontaneo dell'infezione.

Il periodo di incubazione, nella infezione da *P. rouxi* indotta mediante inoculazione di sangue, ha avuto, nei 28 canarini nei quali tali periodo è stato lasciato decorrere spontaneamente (gruppi *a* e *b*), una durata media di 21,71

TABELLA 1.

Durata del periodo di incubazione dell'infezione da Plasmodium rouxi *in canarini normali e in canarini previamente splenectomizzati.*

	Numero dei canarini studiati	Durata, in giorni, del periodo di incubazione		
		Durata massima	Durata minima	Durata media
Canarini normali. . .	28	38	10	21,71
Canarini splenectomizzati prima della inoculazione	8	18	7	12,75

TABELLA 2.

Comportamento della infezione da Plasmodium rouxi *in canarini non splenectomizzati.*

Numero del canarino	Durata in giorni della incub - zione	Giorno di positività in cui si è verificata la morte	OSSERVAZIONI
1	38	38	La parassitemia, molto bassa (+), (°) subisce un progressivo aumento (++) prima della morte.
2	22	32	Parassitemia uniformemente bassa (+) fino alla morte.
3	22	170	Id.
4	24	65	Id.
5	20	56	Id.
6	20	31	Id.
7	38	4	Id.
22	16	286	Id.
23	13	—	Vivente ancora dopo 773 giorni di positività con parassitemia uniformemente bassa (+)
24	13	60	Parassitemia uniformemente bassa (+) fino alla morte.
25	10	267	Id.
26	14	226	La parassitemia, sempre molto bassa (+) per tutto il decorso della infezione, subisce un lieve aumento (++) 14 giorni prima della morte del canarino, aumento che si osserva solo per un periodo di 6 giorni.
27	14	237	Parassitemia uniformemente bassa (+) fino alla morte.
28	15	30	Id.
74	31	55	Id.
75	31	50	Id.
76	32	27	Id.
77	27	53	Id.

(°) L'intensità della parassitemia è stata da noi convenzionalmente rappresentata nel modo che segue:

(+) = un parassita ogni 8-10 campi
(++) = un parassita per ogni campo
(+++) = più di un parassita per campo

giorni (vedi tabella I) con limiti massimo e minimo rispettivamente di 38 e di 10 giorni (vedi tabelle II e III).

Il decorso spontaneo dell'infezione nei 18 canarini non splenectomizzati (vedi tabella II) si è manifestato con il quadro caratteristico dell'infezione da *P. rouxi*: parassitemia molto bassa sin dall'inizio (un parassita ogni 8 - 10 campi), senza sensibili variazioni nella intensità; tale quadro resta più o meno invariato per tutto il tempo della vita dell'ospite.

Azione della splenectomia sul decorso dell'infezione.

Nei dieci canarini nei quali si è asportata la milza in un periodo di tempo variato da 23 a 63 giorni dopo il primo giorno di positività nel sangue (vedi tabella III), si sono osservati i seguenti fenomeni.

In 4 dei dieci canarini, e cioè nei numeri 20, 38, 44, 56 l'intensità della parassitemia non ha mostrato variazioni dopo la splenectomia per tutta la durata della vita (127 - 194 giorni).

In altri 3 canarini (46, 55, 66), subito dopo l'intervento si è osservato un lieve aumento della parassitemia che si è protratto per alcuni giorni (al massimo 7); la parassitemia è quindi rapidamente tornata al suo livello abituale nel quale si è mantenuta per tutto il tempo della vita dell'ospite (89-119 giorni).

Nel canarino 52 si è avuto un aumento della parassitemia per 7 giorni, seguito da diminuzione dei parassiti e morte sedici giorni dopo la splenectomia.

Nel canarino 14 si è verificato, dopo splenectomia, un aumento progressivo della parassitemia che si è protratto fino alla morte dell'animale avvenuta dieci giorni dopo l'operazione.

Il canarino 45 è morto 5 giorni dopo l'operazione senza aumento dei parassiti nel sangue.

Decorso dell'infezione in canarini previamente splenectomizzati.

Negli 8 canarini splenectomizzati prima della inoculazione (vedi tabella IV) il tempo di incubazione appare ridotto di circa un terzo rispetto a quello riscontrato in canarini non splenectomizzati; la durata media di questo periodo è stata infatti di 12,75 giorni con limiti massimo e minimo rispettivamente di 18 e di 7 giorni.

Per quanto riguarda il corso dell'infezione si può constatare che in 5 degli 8 canarini (nn. 10, 11, 12, 15, 17) l'infezione ha deviato dal suo quadro normale, manifestandosi, subito dopo il periodo di incubazione, con una parassitemia discretamente elevata (più di un parassita per campo) che si è protratta per un massimo di 30 giorni, come nel canarino 10.

Tre canarini (nn. 11, 15, 17) sono morti durante questo periodo di rigogliosa invasione parassitaria, dopo un numero di giorni variato da 15 a 27, di positività nel sangue.

TABELLA 3.

Comportamento della infezione da Plasmodium rouxi *in canarini splenectomizzati nel corso della infezione.*

Numero del canarino	Durata (in giorni) della incubazione	Giorno di positività nel quale è stata effettuata la splenectomia	Risultati dopo splenectomia
14	19	25	Morte avvenuta 10 giorni dopo splenectomia. La parassitemia molto bassa (+) al momento dell'intervento, aumenta in seguito progressivamente (+++) fino alla morte.
20	21	63	Morte avvenuta 177 giorni dopo la splenectomia. Nessun aumento, dopo l'intervento, della parassitemia la quale subisce invece un sensibile aumento (+++) durante i tre giorni che precedono la morte.
38	12	59	Morte avvenuta 194 giorni dopo la splenectomia. La parassitemia molto bassa (+), non subisce aumenti né dopo l'intervento né prima della morte.
44	25	25	Morte avvenuta 171 giorni dopo la splenectomia. Nessun aumento della parassitemia dopo l'operazione.
45	25	23	Morte al 5° giorno dalla splenectomia con parassitemia molto bassa (+).
46	24	27	Morte avvenuta 119 giorni dopo la splenectomia. Lieve, fugace aumento (++) della parassitemia dopo l'operazione.
52	24	27	Morte avvenuta 16 giorni dopo la splenectomia. La parassitemia subisce un modesto aumento (++) che inizia 5 giorni dopo l'operazione e si protrae per 7 giorni. Alla morte del canarino la parassitemia era di nuovo molto bassa (+).
55	23	28	Morte avvenuta 89 giorni dopo la splenectomia. La parassitemia, costantemente bassa (+) fino alla morte, subisce un lieve aumento (++) che si verifica 5 giorni dopo l'operazione e si protrae per 7 giorni.
56	21	30	Morte avvenuta 127 giorni dopo la splenectomia. Parassitemia uniformemente bassa (+) fino alla morte; nessun aumento dopo l'operazione.
66	14	38	Morte avvenuta 108 giorni dopo la splenectomia. Dieci giorni dopo l'operazione si verifica un sensibile aumento (+++) della parassitemia che si prolunga per 7 giorni dopo i quali torna ad essere costantemente bassa fino alla morte.

Nei canarini 10 e 12 l'infezione, dopo un primo periodo di parassitemia elevata ha proseguito, con il quadro in cui è tipica la scarsezza dei parassiti, per tutto il tempo della vita del canarino.

TABELLA 4.

Comportamento della infezione da Plasmodium rouxi *in canarini splenectomizzati prima della inoculazione.*

Numero del canarino	Periodo di tempo, in giorni, intercorso tra splenectomia e inoculazione	Durata, in giorni, della incubazione	RISULTATI
9	3	7	Morto al 17° giorno di positività con parassitemia uniformemente bassa (+).
10	9	14	Morto al 180° giorno di positività. Attacco primario prolungatosi per 30 giorni con parassitemia elevata (+++). Successivamente parassitemia bassa (+) fino alla morte.
11	6	13	Morto al 27° giorno di positività con parassitemia progressivamente crescente (++) fino alla morte.
12	25	18	Morto al 45° giorno di positività. Per 15 giorni dall'inizio della positività, la parassitemia risulta discretamente elevata (++) per poi scendere ad un livello molto basso (+) nel quale si mantiene fino alla morte.
13	24	14	Morte al 140° giorno di positività, con parassitemia costantemente bassa (+) per tutto il decorso dell'infezione.
14	24	13	Morte al 142° giorno di positività, con parassitemia costantemente bassa (+) per tutto il corso dell'infezione.
15	24	12	Morte al 17° giorno di positività, con parassitemia progressivamente crescente (+++) fino alla morte.
17	23	11	Morte al 15° giorno di positività, on parassitemia progressivamente crescente (+++) fino alla morte.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti si rende evidente che la splenectomia effettuata prima di indurre l'infezione da *P. rouxi* o durante il corso dell'infezione stessa può produrre modificazioni rispetto al decorso spontaneo in canarini non splenectomizzati.

Tali modificazioni si possono riassumere come segue:

Incubazione. Nei canarini previamente splenectomizzati l'incubazione è di durata di circa un terzo più breve che nei canarini normali (media di giorni 12,75 con limiti massimo e minimo di 18 e 7 giorni rispetto alla media di 21,71 giorni con limiti massimo e minimo di 38 e 10 giorni).

Durata della sopravvivenza dei canarini. La sopravvivenza media negli 8 canarini splenectomizzati prima dell'infezione è risultata di 73 giorni e quindi inferiore a quella dei 18 canarini non splenectomizzati che è stata di + di 136 giorni (*).

Parassitemia. La splenectomia ha prodotto un aumento del numero dei parassiti in 5 su 10 dei canarini splenectomizzati durante l'infezione e un'infezione con numero di parassiti superiore alla norma in 5 su 8 dei canarini splenectomizzati prima dell'infezione.

In 4 casi (1 del primo gruppo e 3 del secondo) l'aumento è stato progressivo fino alla morte.

Negli altri 6 canarini l'aumento è stato transitorio, e precisamente di 7 giorni nei 4 canarini splenectomizzati durante l'infezione, e di 15 e 30 giorni nei 2 canarini splenectomizzati prima dell'infezione.

E' interessante d'altra parte notare che l'ablazione della milza sia prima che durante l'infezione può non modificare affatto il normale decorso, come è avvenuto in 4 su 10 canarini splenectomizzati durante l'infezione e in 3 su 8 canarini splenectomizzati prima dell'inoculazione.

Concludendo, il *P. rouxi* presenta una più attiva moltiplicazione nel canarino dopo ablazione della milza, come è indicato dal minor tempo di incubazione nei canarini previamente splenectomizzati e dall'aumento numerico dei parassiti che può essere progressivo fino alla morte, il che non si verifica mai nei canarini non splenectomizzati. Tuttavia l'aumento numerico dei parassiti è in molti casi transitorio e in altri non si verifica affatto.

Il complesso di tali risultati indica che pur non potendosi negare un'azione della milza nell'infezione da *P. rouxi*, tale azione non appare determinante come in altre infezioni da plasmodi.

(*) Scriviamo + di 136, perchè la media di 136 risulta alla data della stesura del presente lavoro, ma a tale data uno dei canarini a cui si riferisce la media è ancora vivente.

RIASSUNTO

Si descrive anzitutto in dettaglio la tecnica per eseguire la splenectomia nel canarino.

Si riferiscono i risultati delle osservazioni sul decorso della infezione da *P. rouxi* in canarini splenectomizzati prima o durante l'infezione stessa.

Si giunge alla conclusione che pur non potendosi negare un'azione della milza sulla moltiplicazione del *P. rouxi* nel canarino, tale azione non appare determinante come in altre infezioni da plasmodi.

SUMMARY

1. A surgical method for performing splenectomy in canaries is idescribed.

2. The parasitological course of the infection by *Plasmodium rouxi* has been followed in canaries which were splenectomized either before or during the infection.

The results show tat although an influence of the spleen on the rate of parasite multiplication cannot be denied, this action is much more limited than in other Plasmodium infections.

BIBLIOGRAFIA

(1) Sergent Edm. et Et., Catanei A. (1928): *Compt. Rend. Acad. Sc.*, *186*, 809-811.

(2) Sergent Edm. et Et., Catanei A. (1929): *Arch. Inst. Pasteur d'Algerie*, *8*, 165.

(3) Sergent Edm. et Et., Catanei A. (1931): *Arch. Inst. Pasteur d'Algerie*, *9*, 399.

(4) Sergent Edm. et Et., Catanei A. (1931): *Bull. Soc. Path. Exot.*, *24*, 327.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 1 - Gennaio 1958

LA LUTTE ANTI-PALUDIQUE DANS LA PLAINE DE LA RUZIZI: 1952 - 1957

H. MEYUS (*) et W. BERVOETS (**)

I — Introduction

Le présent exposé est un bref compte-rendu des observations faites au cours des travaux anti-paludiques dans la plaine de la Ruzizi et des résultats obtenus à la suite des campagnes de pulvérisations de D.D.T. à action rémanente, portant sur quatre années successives.

L'analyse de ces résultats donne une idée générale de l'état paludologique dans cette région.

I — Description de la zone

1) *Emplacement et caractéristiques*

La plaine de la Ruzizi constitue la partie nord de la région naturelle de l'IMBO. Elle a une superficie d'environ 179.000 Hectares. Cette plaine peu accidentée a une altitude de 800 mètres dans le sud à Usumbura, altitude qui augmente graduellement jusqu'à 1.000 mètres dans le nord près de Bugarama. Elle est traversée par des rivières dévallant des montagnes et coulant de l'est à l'ouest, c'est à dire de la crête Congo-Nil vers la rivière Ruzizi. Il y existe également quelques rivières asséchées pendant la saison sèche, semblables aux oueds sahariens. La fertilité du sol, composé d'alluvions, dépend de l'irrigation que le grand nombre de rivières rend aisément réalisable. On y trouve de vastes cultures de manioc, de maïs, d'arachides, de riz, de patates douces, d'haricots, de bananiers et de coton.

(*) *Directeur du Service de l'Hygiène du Ruanda-Urundi.*
(**) *Inspecteur des Services de l'Hygiène du Congo Belge et du Ruanda-Urundi.*

2) *Population et logement*

Dans la zone envisagée vit un total de 40.000 habitants environ, comprenant des autochtones de l'IMBO, des immigrants Barundi et des saisonniers (novembre-février et mai-juin).

Les trois types de cases qu'on trouve dans la plaine sont les suivants:

a) des cases rondes ayant la forme d'une ruche; leurs parois sont faites en tiges végétales et leur toit est constitué de paille.

b) des cases cylindriques le plus souvent construites en pisé; leur toit est formé de feuilles de bananiers.

c) des cases rectangulaires, soit en pisé, soit en roseaux (matété) avec un toit de paille.

Certaines cases possèdent des cloisons qui les divisent en plusieurs parties. Celles-ci sont:

— soit fixes en pisé ou en « matété »;
— soit amovibles consistant en nattes suspendues.

La cuisine se fait dans la hutte même. De ce fait le cône du toit est constamment enduit de suie provenant du feu entretenu dans la case.

3) *Communication et transports*

La plupart des villages sont reliés les uns aux autres par un excellent réseau routier et sont ainsi aisément accessibles. Une route asphaltée très importante relie Usumbura à Bukavu et traverse toute la zone du sud au nord. Le transport du matériel, des produits de désinsectisation et du personnel peut de ce fait être réalisé sans difficulté.

4) *Climat*

Le climat est tropical, mais assez sec. En saison sèche la plaine est balayée l'après-midi par des vents du sud très dessèchants. La température maximale est de 33°, sa moyenne annuelle de 23° Celsius. Le total annuel des pluies varie entre 800 et 900 mm. Le graphique 2 donne le relevé pluviométrique depuis septembre 1953 à août 1956 pour toute la plaine de la Ruzizi.

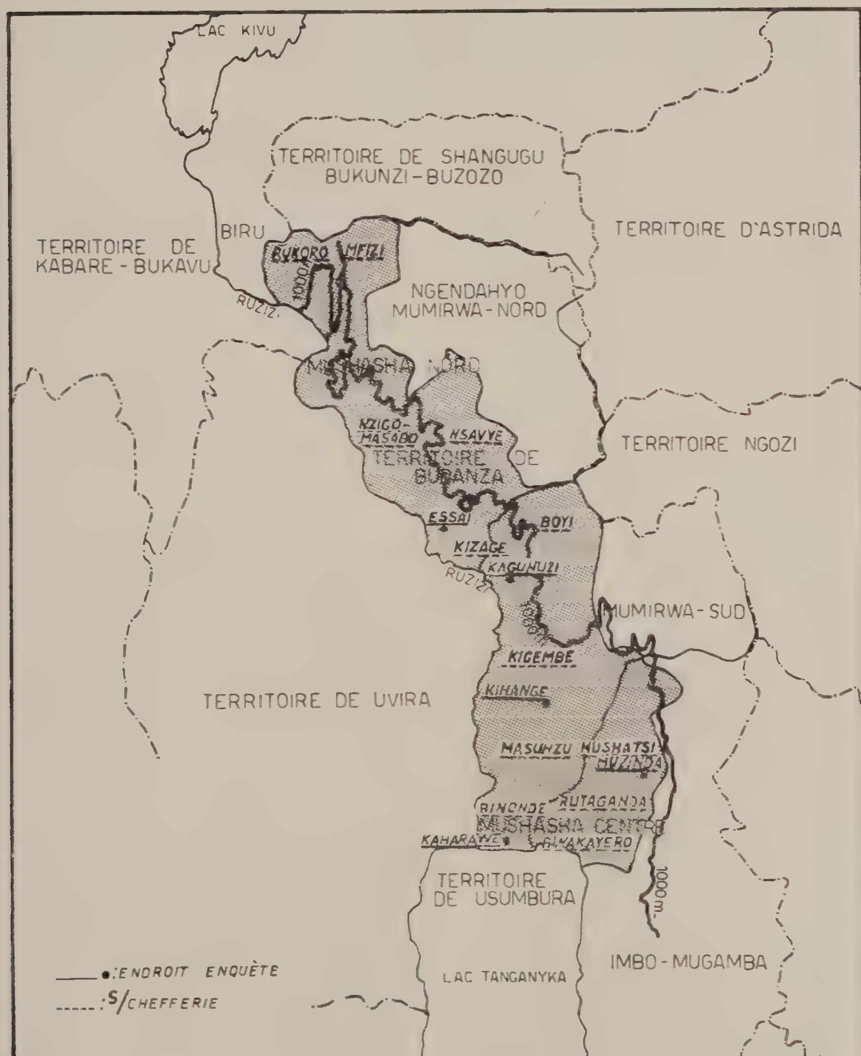
III — Observations entomologiques

Comme dans de nombreuses autres régions de l'Afrique Centrale, *Anopheles gambiae* constitue dans la plaine de la Ruzizi le vecteur principal du paludisme, mais *Anopheles funestus* intervient également pour maintenir l'endémicité malarienne.

Les autres anophèles qui y sont observés sont: *pharoensis, coustani, squamosus, marshalli, maculipalpis* et quelques rares *christyi*.

a) Anopheles gambiae

Les gîtes larvaires dans la plaine sont en majeure partie artificiels, crées par l'activité humaine. Les gîtes naturels par contre sont formés par des



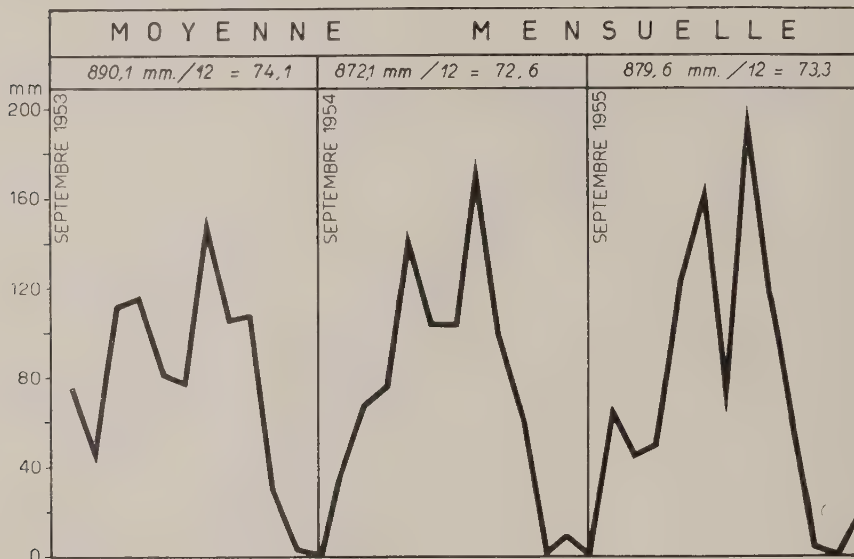
Graf. 1.

flaques d'eau de pluie, des débordements et des « back-waters » de rivières, plus rarement des mares et des étangs avec une végétation émergeante et

flottante. Deux facteurs influencent la densité des populations endophiles de *A. gambiae*:

— le régime des pluies: c'est au commencement de la saison des pluies que la prolifération anophélienne gambienne se présente avec le maximum d'intensité. Les grosses pluies ultérieures par contre gênent le développement larvaire. Après la saison des pluies, la densité anophélienne décroit fortement.

— le développement économique et de pair avec lui l'accroissement de la population dans les paysannats.



Graf. 2.

Ce second facteur est plus complexe car l'occupation humaine concomitante apporte avec elle des gîtes larvaires péri-domestiques (puits, vidanges, pneus usés) très importants au début des pluies. La mise en valeur économique de régions jadis quasi désertes, ajoute aux gîtes naturels relativement peu nombreux, ceux très nombreux, crées par les canaux d'irrigation, les ornières, les fossés de drainage, les fuites des canalisations d'eau etc.. Les anophèles trouvent ainsi des conditions extrêmement favorables à leur multiplication.

Quoique nous n'ayons pas entrepris l'étude systématique de la question, des observations fragmentaires nous portent à croire que dans la grande majorité des cas, la transmission malarienne se fait par des piqûres à l'intérieur des huttes. Après s'être gorgé, *A. gambiae* va se reposer à l'endroit le plus commode pour lui, endroit qui peut être soit artificiel, soit naturel. Sa préférence semble donc dépendre surtout de facteurs écologiques.

Dans cette région, très aride avant sa mise en valeur, les gîtes possibles étaient peu nombreux et relativement peu protégés. Maintenant que le facteur humain se développe, *A. gambiae* trouve dans les huttes un gîte artificiel qui lui convient très bien.

L'intensité de *A. gambiae* (I.M.G.) avant les campagnes était à Kihanga 343 et aux autres endroits: Kaharawe 45,11, Muzinda 46,81 et Mirombero 31,25.

$$\text{I. M. G.} = \frac{\text{Nbre } A.\ gambiae \times \text{Nbre Anophèles capturés} \times 100.}{\text{Nbre Anophèles déterminés} \times \text{Nbre de maisons.}}$$

b) Anopheles funestus

Cette espèce est très fréquente en dessous de 900 mètres et est le vecteur le plus important après *Anopheles gambiae*. En saison des pluies les rivières sortent de leurs rives et forment des marécages quasi permanents à haute végétation (herbes, roseaux etc.) donnant l'ombre propice à la profilération de l'insecte. Les petits ruisseaux (longueur totale: 250 km) profonds et peu larges, coulant au milieu de cultures indigènes, sont aussi d'excellents gîtes à *A. funestus*.

Suite à la grande stabilité de la population d'*A. funestus*, résultant de sa prédilection pour les eaux relativement permanentes, il est le responsable de la continuation des infections en saison sèche.

La densité des *A. funestus* (I.M.F.) s'établit à Kihanga à 263 et aux autres endroits: Kaharawe 11,64, Muzinda 165,9 et Mirombero 83,65. Il est intéressant de noter qu'il est normalement très difficile de trouver des larves d'*A. funestus*, même dans les régions où les adultes abondent dans les habitations.

c) Anopheles pharoensis

Quoique nous n'ayons pas pu établir d'indice sporozoitique, nous sommes portés à croire que cet anophèle n'est pas un vecteur, ou tout au moins pas un vecteur appréciable. En effet, dans la région Kaharawe cet anophèle abonde tandis que *gambiae* et *funestus* y sont relativement rares. Or l'index plasmodique est de 12%, alors qu'ailleurs où *pharoensis* est rare l'index plasmodique est de: 19% à Mirombero, 37% à Muzinda et 20% à Kihanga.

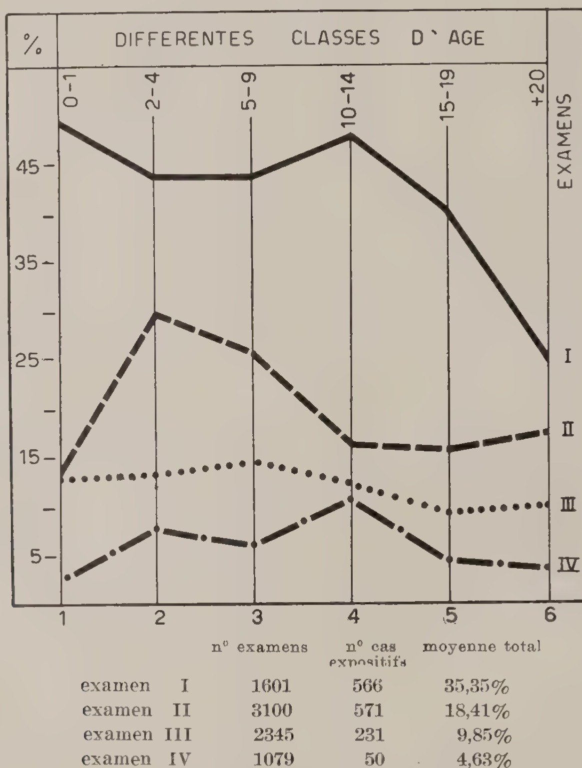
Il se développe uniquement dans les flaques d'eau boueuses qui criblent le terrain sablonneux du delta de la Ruzizi.

d) Anopheles squamosus

A. squamosus se trouve dans les flaques d'eau bien ensoleillées et bien oxigénées. Parfois on trouve également des gîtes dans les courants lents à végétation flottante.

e) Anopheles coustani

Ses gîtes larvaires sont très variés, aussi bien dans les eaux courantes que dans les eaux stagnantes. Les gîtes sont ensoleillés ou ombragés. On les rencontre assez souvent dans les rizières.



	n° examens	n° cas expositifs	moyenne total
examen I	1601	566	35,35%
examen II	3100	571	18,41%
examen III	2345	231	9,85%
examen IV	1079	50	4,63%

Graf. 3. — Index plasmodique.

f) Anopheles marshalli

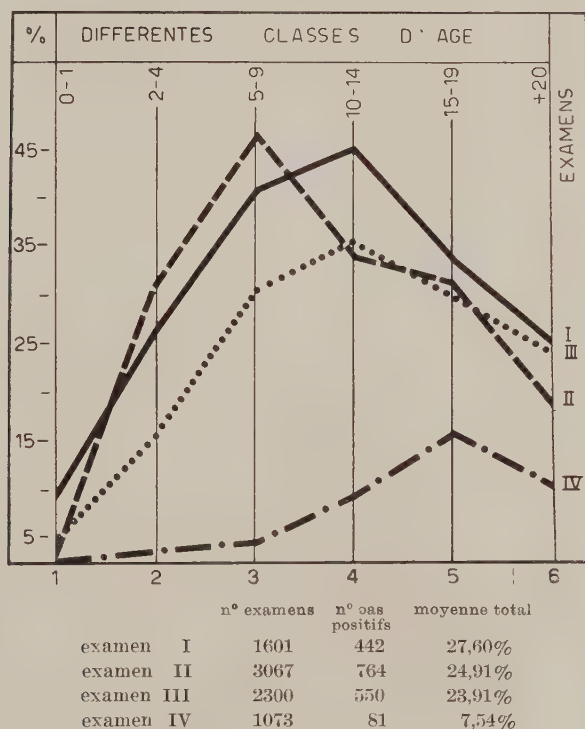
Il se trouve surtout dans les canaux d'irrigation et dans les ruisseaux venant de la montagne, ruisseaux dont les rives semblent être fréquentées par les *A. marshalli* à cause du courant plus lent.

g) Anopheles maculipalpis

Les larves se trouvent de préférence dans les marécages et les rivières en voie d'assèchement: en saison sèche, on les rencontre dans les petites mares stagnantes.

h) Anopheles christyi

Rencontré accidentellement, venant très probablement des hauts plateaux, proches d'une dizaine de kilomètres. Nous ne croyons pas que cet anophèle intervient dans la transmission de la malaria. En effet, les dissections des *A. christyi* capturés en montagne, ne nous ont jamais donné l'occasion de trouver un seul anophèle parasité. Nous nous référons en plus aux travaux des



	n° examens	n° cas positifs	moyenne total
examen I	1601	442	27,60%
examen II	3067	764	24,91%
examen III	2300	550	23,91%
examen IV	1073	81	7,54%

Graf. 4. — Index splenique.

Docteurs FAIN et JADIN (« Contribution à l'étude du paludisme en pays d'altitude » - *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, XXXI, 1951, 353-364) qui sont parvenus aux mêmes conclusions.

i) Anopheles longipalpis

Au cours des recherches après la première campagne de désinsectisation, nous avons trouvé une autre espèce, *A. longipalpis*.

La larve a été découverte le plus souvent dans une eau fraîche, parfois dans une eau stagnante et ombragée. La détermination en a été faite au la-

boratoire d'Astrida. Sa description correspondait à *A. longipalpis* Theobald décrit dans le livre de BOTHA DE MEILLON.

IV — TRAVAUX DE DEPARASITATION

a) *Enquête avant la campagne*

La forme de malaria la plus souvent observée est le *Plasmodium falciparum* (96% des cas), Les autres formes observées sont le *P. vivax* (2,5% des cas), le *P. malariae* (0,5% des cas) et des formes mixtes *falciparum-vivax* (1% des cas).

Afin de pouvoir juger de l'efficacité réelle des traitements au DDT, les aspersions d'insecticide ont été précédées par l'enquête malariologique suivante:

1) Examen splénique:

6 groupes d'âge ont été examinés: les enfants de 0 - 1, de 2 - 4, de 5 - 9, de 10 - 14 ans; les adolescents de 15 - 19 ans et les adultes au-dessus de 20 ans.

La palpation de la rate a été faite en position horizontale suivant le classement de Hackett II.

2) Examen du sang:

Les mêmes personnes choisies pour l'examen splénique ont été examinées et on été classées suivant les mêmes groupes d'âge.

3) Capture d'anophèles adultes et de larves.

Les travaux de déparasitation s'échelonnent sur les années 1951 - 1957.

a) *Première campagne* 1952 - 1953 (2 *cycles*).

La lutte anti-paludique au moyen du DDT dans la plaine de la Ruzizi a débuté en juin-juillet 1951 par un essai dont les résultats n'ont pu ête contrôlés. Au total 6.757 cases indigènes furent dédétisées au nord-ouest d'Usumbura, mais dès 1952 les travaux furent étendus à la quasi-totalité de la plaine (sauf la s/chefferie Rukoro) et menés avec méthode.

La campagne débuta en juillet 1952 et se termina en septembre 1953; elle comporta deux cycles de traitements.

1er cycle: 16.301 cases indigènes et 3.040 Ha de marais.

2me cycle: 17.731 cases indigènes et 3.165 Ha de marais.

b) *Deuxième campagne* 1954 - 1956 (3 *cycles*).

Cette deuxième campagne a débuté en mai 1954 et s'est terminée en mars 1956. Elle comporta trois cycles de traitements.

1er cycle: 18.169 cases indigènes et 2.550 Ha de marais;

2me cycle: 18.611 cases indigènes et 700 Ha de marais;

3me cycle: 19.749 cases indigènes.

Lors de ces trois cycles toute le plaine de la Ruzizi a été dédétisée. En ce qui concerne les marais, ils n'ont été traités qu'une seule fois, pendant la saison sèche, c'est à dire vers la mi-juillet.

La surface d'eau, la seule à traiter, est estimée à 1/10ème de la surface totale. Ce traitement a été abandonné en mars 1955.

c) *Troisième campagne* 1956 - 1957 (2 *cycles*).

La troisième campagne est en cours. Elle s'étend de juin 1956 à juin 57 et comporte deux cycles de traitements.

1er cycle: 24.414 cases indigènes.

2me cycle: en cours.

Les travaux on été organisés de la façon suivante:

1) *Adjudication*

Les travaux de dédétisation faisant l'objet d'une adjudication, le Service de l'Hygiène établit un devis. Dans le calcul de celui-ci on tient compte des composantes suivantes:

1. — le nombre de cases à dédétiser et leur superficie moyenne (30 m^2);

2. — le nombre de jours de travail;

3. — le nombre d'équipes nécessaires, en se basant sur la moyenne journalière de travail à effectuer par un travailleur. Il peut aisément assurer le traitement de 40 cases par jour;

4. — le nombre de capitas-mécaniciens. Il faut un capita-mécanicien pour 10 équipes; celui-ci effectue les réparations éventuelles des pulvérisateurs, veille à la bonne marche du travail dans son secteur et réalise une liaison constante avec l'européen chargé des contrôles;

5. — le matériel: pulvérisateurs, eaux pour la préparation des solutions, sachets pour la poudre DDT. Une réserve de pulvérisateurs est exigée;

6. — les moyens de transport et les kilomètres à parcourir;

7. — le nombre de porteurs requis pour le transport des poudres DDT et du matériel dans les régions éloignées des routes carrossables;

8. — le nombre des cycles de traitements;

9. — les produits à employer:

marais: les marais sont traités avec une poudre flottable à 5% au moyen de poudreuses à raison de 2 g de DDT pur par mètre carré de surface d'eau;

cases: les cases indigènes sont traitées avec une suspension à 5% de DDT, appliquée au moyen de pulvérisateurs à raison de 2 g de DDT pur par mètre carré;

10. — le nombre d'agents européens, dont chacun a environ 50 équipes en charge.

2) *Organisation*

a) *Avertissements*: les agents préposés aux travaux fournissent périodiquement aux Administrateurs de Territoire un relevé des jours probables de leur passage dans les différentes s/chefferies à traiter. De cette façon, l'administrateur sera en mesure d'avertir les populations intéressées et d'intervenir auprès des autorités autochtones afin d'assurer une marche régulière du travail.

b) *Traitements*: les équipes se rendent sur les collines, accompagnées du capita de colline qui leur désigne toutes les cases à traiter. Un membre de la famille au moins doit rester à la maison afin de prêter toute aide voulue aux équipes de désinsectisation. Dans chaque case il y a lieu de traiter le promontoire d'entrée et l'intérieur de la case. L'intérieur comprend les cloisons, les murs et les lits. On insiste tout particulièrement sur le pourtour de la case et le dessus de lits. Il est inutile de traiter l'intérieur du toit conique formant plafond, en raison d'un continuel recouvrement de suie provenant des feux entretenus dans les cases.

Pulvérisateurs employés: Leman, Samdow, Vermorell ou Birchmeyer. L'équipe emploie une fiche par propriétaire, fiche sur laquelle sont inscrits la date et le nom du travailleur qui effectue le traitement, puis le nom du propriétaire et le nombre de cases traitées. Cette fiche reste entre les mains du propriétaire de la case.

— la date: celle-ci a une grande importance pour les prélèvements des produits sur les murs traités en vue d'une analyse des quantités de poudre DDT aspergée;

— le nom du travailleur qui a effectué le traitement: au cas où le travail d'une équipe ne serait pas acceptable ces fiches aideront à retrouver les cases traitées par cette équipe. Ceci permet de refaire la partie non réceptionnée et évite de devoir refaire toute une colline, voir une s/chefferie;

— le nom du propriétaire et le nombre de cases traitées: ceci pour faciliter le contrôle du Service de l'Hygiène et pour éviter l'échange des fiches entre indigènes lors des contrôles.

Chaque travailleur a une feuille volante sur laquelle se trouvent les indications suivantes: date, chef d'équipe, s/chefferie, colline, liste des cases traitées, c'est à dire noms des propriétaires et nombre de cases traitées. Cette feuille constitue le rapport journalier servant de base à l'établissement des factures. Après achèvement d'une chefferie, tous ces rapports sont envoyés au Service de l'Hygiène pour contrôle et réception éventuelle. Des agents européens suivent les travaux de très près.

c) *Contrôles*

— seules les poudres conformes aux normes de l'OMS sont employées;

— analyse des prélèvements: on fait un grattage pour chaque tranche de 2.000 huttes traitées, soit six par chefferie.

Les grattages portent sur une surface de 5 × 5 cm. et sont analysés selon la méthode Alessandrini. Ces prélèvements sont faits sur les différents murs et cloisons de la hutte afin de contrôler si les travailleurs dédétisent bien toute la hutte et non seulement les murs de l'entrée.

Les résultats de ces analyses nous ont donné les chiffres suivants:

1) dans la s/chefferie Rukoro, après quatre semaines de traitement:

1,2 g - 1,3 g - 3 g - 2,5 g - 1,7 g - 3 g.

2) dans la s/chefferie Kigembe et Masunzu, après quatre semaines de traitement:

1,06 g - 1,54 g - 1,54 g - 0,57 g - 2,8 g - 1,9 g.

3) dans la s/chefferie de Kisage, après trois semaines de traitement:

2,24 g - 0,92 g - 1,2 g - 2,1 g - 2,72 g - 1,68 g.

4) dans la s/chefferie Nzigomasaba, après quatre semaines de traitement:

1,88 g - 1,46 g - 2,32 g - 1,08 g - 2,76 g - 1,12 g.

Comme on le voit, l'analyse de ces prélèvements donne souvent des chiffres différents. Ceci est dû à ce que les travailleurs chargés de ces campagnes — bien qu'ayant fait un stage d'apprentissage pour la technique du « home-spray » — ne parviennent pas toujours à asperger les 2 g/m²; ceci explique les écarts dans les dépôts d'insecticides d'une case à l'autre. N'oublions pas que le travail s'effectue en zone rurale et non pas dans un laboratoire. Même si le matériel est en bon état de fonctionnement et s'il est utilisé par des ouvriers ayant eu une formation préalable, il se produira inévitablement des différences dans le rendement de l'appareil.

— contrôle du nombre de cases traitées:

Un agent contrôleur se rend dans une chefferie achevée et contrôle tous les rapports journaliers de chaque s/chefferie. Il établit le total des cases renseignées sur les rapports journaliers et le total des cases réellement traitées. La différence entre ces deux totaux, exprimée en %, est établie: elle est appliquée ensuite sur le total renseigné pour toute la chefferie.

1) *Enquêtes - index spléniques:*

a) *Avant la campagne: entre les mois de mai et novembre* 1952.

Kihanga, Kaharawe Mirombero et Muzinda.

Ages:	Personnes examinées	Rates positives	Classification Hackett II 1	2	3	4	5	°/o Positives
0— 1	149	15	11	3	1	—	—	10,06
3— 4	160	43	22	13	8	—	—	26,87
5— 9	175	70	39	17	10	4	—	40,—
10—14	194	86	32	33	19	1	1	44,33
15—19	158	52	24	18	8	2	—	32,97
+20	765	176	59	84	31	2	—	23,—
Totaux:	1601	442	187	168	77	9	1	Moyenne- 27,60

b) *Fin de la première campagne (2 cycles): vers septembre* 1953.

Kaharawe, Kihanga.

Ages:	Personnes examinées:	Rates positives	Classification Hackett II 1	2	3	4	5	°/o Positives
0— 1	82	4	4	—	—	—	—	4,87
2— 4	386	121	34	69	18	—	—	31,34
5— 9	250	117	31	64	20	2	—	46,80
10—14	195	65	18	37	9	—	1	34,03
15—19	169	51	16	30	5	—	—	30.17
+20	1939	406	65	295	40	5	1	20,11
Totaux:	3067	764	168	495	92	7	2	24,91

c) *Vers le milieu de la deuxième campagne: juillet 1954 à decembre* 1955.

Kihanga, Muzinda, Mirombero et Kagunuzi.

Ages:	Personnes examinées:	Rates positives:	Classification Hackett I 1	2	3	4	5	°/o Positives
0— 1	136	9	3	5	1	—	—	6,64
2— 4	248	41	11	23	5	1	1	16,53
5— 9	260	83	19	56	7	1	—	31,92
10—14	146	54	15	37	2	—	—	36,99
15—19	121	36	10	21	4	1	—	29,75
+20	1389	327	108	169	42	8	—	24,26
Totaux:	2300	550	166	311	61	11	1	23,91

d) *Vers le milieu de la troisième campagne : décembre 1956-Janvier 1957. Kihanga et Kaharawe.*

Ages:	Personnes examinées	Rates positives:	Classification Hackett II 1	2	3	4	5	°/₀ Positives
0— 1	40	—	—	—	—	—	—	—
2— 4	112	1	1	—	—	—	—	0,89
5— 9	187	4	3	1	—	—	—	2,13
10—14	87	8	8	—	—	—	—	9,19
15—19	42	7	3	4	—	—	—	16,66
+20	605	61	41	19	—	1	—	10,08
Totaux :	1073	81	56	24	—	1	—	7,54

2) *Enquêtes - index plasmodiques :*

a) *Avant la campagne : entre les mois de mai et novembre 1952. Kihanga, Kaharawe, Mirombero et Muzinda.*

Ages	Total des personnes examinées :	Gouttes épaisses positives :	°/₀ Positives
0— 1	149	73	48,99
2— 4	160	71	44,37
5— 9	175	85	44,—
10—14	194	92	47,42
15—19	158	64	40,—
+20	765	181	23,65
Totaux :	1601	566	35,35

b) *Fin de la première campagne : vers septembre 1953. Kihanga et Kaharawe.*

Ages	Total des personnes examinées	Gouttes épaisses positives :	°/₀ Positives
0— 1	82	12	14,63
2— 4	386	115	29,79
5— 9	250	66	26,40
10—14	191	30	15,75
15—19	169	26	15,38
+20	2022	322	15,92
Totaux :	3.100	571	18,41

Il est á noter que de la quinine prophylactique a été distribuée aux immigrants à Kihanga et aux autres centres d'accueil des paysannats de mai 1953 à janvier 1955 à raison de deux distributions par semaine : adultes 2 g, enfants 1,5 g suivant les âges.

c) *Vers le milieu de la deuxième campagne*: *juillet* 1954 *à décembre* '55.
Kihanga, Muzinda, Mirombero et Kagunuzi.

Ages	Total des personnes examinées	Gouttes épaisses positives:	°/₀ Positives
0— 1	136	18	13,23
2— 4	248	32	12,90
5— 9	260	37	14,23
10—14	148	18	12,16
15—19	126	11	8,72
+20	1427	115	8,05
Totaux:	2345	231	9,85

d) *Vers le milieu de la troisième campagne*: *décembre* 1956-*janvier* '57.
Kihanga et Kaharawe.

Ages	Total des personnes examinées	Gouttes épaisses positives:	°/₀ Positives
0— 1	40	1	2,50
2— 4	112	8	7,14
5— 9	187	12	6,46
10—14	87	9	10,34
15—19	42	2	4,76
+20	599	18	3,—
Totaux:	1079	50	4,63

VI — Conclusions

Après six traitements couvrant une période de quatre années, les résultats obtenus par la désanophélisation sont très encourageants. En effet, jugé d'après l'indice parasitaire du nourrisson (0 à I ans) — qui donne une bonne mesure d'endémicité — celui-ci s'établissait à 48,99% avant la campagne; il a baissé graduellement à 14,63% après la première campagne, à 12,23% après la deuxième campagne et à 2,50% au cours de la troisième campagne. Les possibilités d'infection ont aussi fortement diminué comme le prouve la moyenne des captures d'anophèles par heure, qui est passée successivement de 33,28 à 13,42 et 0,25. Ceci est confirmé par les indices *gambiae* (I.M.G.) et *funestus* (I.M.F.) cités plus haut.

Une résistance envers le DDT n'a pas encore été observée, seul produit employé dans nos campagnes. Il est sans doute prématuré d'affirmer que le contact préalable de l'insecticide avec les larves est indispensable à la réalisation de la résistance. Néanmoins nous avons arrêté le traitement antilarvaire en 1954. Malheureusement, même si le paludologue évite d'employer ces

3) *Enquêtes - Captures d'anophèles adultes et de larves:*

	ADULTES:			LARV S:		
Espèce :	Avant la campagne :	Fin de la 1re camp.:	Vers la milieu 2me camp.:	Avant la campagne:	Fin de la 1re camp.:	Vers la milieu 2me camp.:
gambiae	1.065	191	7	737	599	45
funestus	720	67	1	8	19	12
pharoensis	930	334	—	181	218	5
squamosus	17	17	—	50	46	28
coustani	61	117	—	246	203	115
marshalli	28	44	1	11	170	15
maculipalpis	5	—	—	47	109	2
christyi	—	—	—	17	11	1
longipalpis	—	3	—	—	1	—
Non identifiés	1.118	155	—	213	1.319	46
	3.944	926	9	1.510	2.659	269
Nombre d'heures de capture :	1.185	69	36	852	216	90
Moyenne / heure	33,28	13,42	0,25	17,72	12,47	2,98

L'intensité de *A. gambiae* (I.M.G.)	: avant la campagne	: Kihanga 343	- Kaharawe 45,11	- Muzinda 46,81	- Mirombero 31,25
	fin 1re campagne	: Kihanga 125,36	- Kaharawe 13,86 -		
	milieu 2me camp.	: Kihanga 63,63 -		- Muzinda 0	- Mirombero 0
L'intensité de *A. funestus* (I.M.P.)	: avant la campagne	: Kihanga 263	- Kaharawe 11,64	- Muzinda 165,90	- Mirombero 83,65
	fin 1re campagne	: Kihanga 44,91	- Kaharawe 0		
	fin 2me campagne	: Kihanga 0 -		- Muzinda 6,06	- Mirombero 0

$$\text{I.M.G.} = \frac{\text{Nombre d'}\textit{Anophèles Gambiae} \times \text{Nombre d'anophèles capturés} \times 100}{\text{Nombre d'anophèles déterminés} \times \text{Nombre de maisons}}$$

produits pour la lutte antilarvaire, les services de l'agriculture les emploient en telles proportions pour la protection des cultures que l'insecticide tombe également sur les gîtes larvaires. Il sera donc prudent de mener la campagne d'éradication dans le plus bref délai possible le facteur temps étant décisif. D'ailleurs l'eradication des larves des espèces d'anophèles vectrices du paludisme dans la vallé de la Ruzizi est irréalisable, aussi bien techniquement qu'économiquement.

Nos résultats auraient peut-être pu être meilleurs encore mais il est à considérer :

1) que la vallée de la Ruzizi est directement influencée par des zones où le paludisme est à l'état endémique et où aucun traitement n'est entrepris (Congo Belge) jusqu'à ce jour ;

2) que la population reste instable. Beaucoup de porteurs de gamétocytes rentrent et sortent des paysannats. Des immigrants viennent de la plaine sud (Usumbura) et des régions surpeuplées de Muramvya (zone indemne de malaria). Les paysannats ont enregistré en 1954 — par exemple — une augmentation de 757 familles;

3) que la population n'est pas suffisamment évoluée pour comprendre la relation entre gîtes larvaires et paludisme.

En ce qui concerne la chimio-prophylaxie, il est pour le moment économiquement et socialement impossible de recourir aux médicaments antipaludiques pour éliminer la malaria dans la plaine de la Ruzizi. Son emploi pourra se justifier dans les dernières phases de la campagne de désinsectisation, quand les foyers seront restreints et bien localisés.

RESUME

1) *Anopheles gambiae* constitue dans la plaine de la Ruzizi le vecteur principal du paludisme, mais *Anopheles funestus* intervient également pour maintenir l'endémicité malarienne. Les autres anophèles qui y sont observés sont : *pharoensis, coustani, squamosus, marshalli, maculipalpis* et quelques rares *christyi*.

Deux facteurs influencent la densité des populations endophiles de l'*Anopheles gambiae* :

— le régime des pluies ;

— le développement économique et de pair avec lui l'accroissement de la population dans les paysannats.

Dans la grande majorité des cas, la transmission malarienne se fait par des *piqûres* à l'intérieur des huttes.

La forme de malaria la plus souvent observée est le *Plasmodium falciparum*.

2) Six traitements couvrant une période de quatre années ont été appliquées. Les travaux de dédétisation font l'objet d'une adjudication, le contrôle est effectué par les Services de l'Hygiène. Seules les poudres conformes aux normes de l'OMS sont employes. Les grattages sont analysés selon la méthode Alessandrini. La difficulté qu' il y a d'asperger les 2 gr/m² en zone rurale et les différences dans le rendement des appareils

pulvérisateurs ,expliquent les écarts dans les dépôts d'insecticides d'une case à l'autre. Le nombre de cases traitées est également contrôlé.

3) Les résultats obtenus par la désanophélisation sont trés encourageants. L'indice parasitaire du nourrisson s'établissait avant la campagne à 48,99% ; il a baissé graduellement à 14,63% après la première campagne, à 13,23% après la deuxième campagne et à 2,50% au cours de la troisième campagne. Les possibilités d'infection ont fortement diminué: la moyenne des captures d'anophèles par heure est passée successivement de 33,28 à 13,42 et 0,25.

Une résistance envers le DDT n'a pas ancore été observée. Il est sans doute prématuré d'affirmer que le contact préalable de l'insecticide avec les larves est indispensable à la réalisation de la résistance. Le traitement antilarvaire a néanmoins été arrêté en 1954. L'éradication des larves des espèces vectrices du paludisme dans la vallée de la Ruzizi est irréalisable, aussi bien techniquement qu' économiquement.

Nos résultats auraient peut-être pu être meilleurs encore mais il faut tenir comte de:

— la situation de la plaine de la Ruzizi, directment influencée par des zones où le paludisme est à l'état endémique et où aucun traitement n'est entrepris jusqu'à ce jour;

— l'instabilité de la population;

— la difficulté de faire comprendre aux indigènes la relation entre gîtes larvaires et paludisme.

L'emploi de médicaments antipaludiques se justifiera dans les dernières phases de la campagne de désinsectisation, quand les foyers seront restreints et bien localisés.

RIASSUNTO

1) Nella pianura del Ruzizi il vettore principale della malaria è rappresentato da *Anopheles gambiae*, ma anche *A. funestus* contribuisce a mantenere l'endemicità della malattia. Gli altri anofeli che sono stati osservati sono: *pharoensis, coustani, squamosus, marshalli, maculipalpis* e qualche raro *christyi*.

Due fattori influenzano la densità delle popolazioni endofile di *A. gambiae*: il regime delle pioggie, lo sviluppo economico e il di pari passo accrescimento della popolazione contadina.

Nella grande maggioranza dei casi, la trasmissione della malaria viene attuata per punture all'interno delle abitazioni.

La forma di malaria più frequentemente osservata è quella da *Plasmodium falciparum*.

2) Nel corso di 4 anni sono stati applicati sei trattamenti. I lavori di irrorazione del DDT vengono aggiudicati a privati; il controllo è effettuato dai Servizi dell'Igiene. Sono impiegate solo polveri conformi alle norme dettate dall'O.M.S.. I prodotti del grattamento delle pareti sono analizzati con il metodo Alessandrini. Gli scarti verificati nel tenore in insetticida tra una casa e l'altra si spiegano con la difficoltà che si ha ad irrorare i 2 g/m² in zona rurale, e con il differente rendimento degli apparecchi polverizzatori. Viene ugualmente controllato il numero delle abitazioni trattate.

3) I risultati ottenuti a mezzo della distruzione degli anofeli sono assai incoraggianti. L'indice parassitario del lattante che prima della campagna raggiungeva il 48,99%, si è gradualmente abbassato al 14,63% dopo la prima campagna, al 13,23% dopo la seconda ed al 2,50% nel corso della terza. Le possibilità d'infezione sono fortemente diminuite: la media delle catture di anofeli per ora è successivamente passata da 33,28 a 13,42 e a 0,25.

Non è stata ancora osservata resistenza al DDT. E' senza dubbio prematuro affermare che perchè si realizzi la resistenza è indispensabile un precedente contatto dell'insetticida con le larve: il trattamento antilarvale è stato tuttavia sospeso nel 1954.

L'eradicazione delle larve delle specie vettrici della malaria nella valle del Ruzizi è irrealizzabile sia tecnicamente che economicamente.

I risultati ottenuti avrebbero forse potuto essere ancora migliori, ma bisogna tener conto: della situazione della pianura del Ruzizi, direttamente influenzata da zone in cui la malaria è endemica ed in cui fino ad oggi non è stato iniziato alcun trattamento; della instabilità della popolazione; della difficoltà di far comprendere agli indigeni le relazioni tra ambienti di sviluppo delle larve e malaria.

L'impiego di medicamenti antimalarici sarà giustificato nelle ultime fasi della campagna anti-insetti, quando i focolai saranno ristretti e ben localizzati.

SUMMARY

1) *A. gambiae* is the main vector in the Ruzizi valley, but *A. funestus* also contributes to the maintenance of malarial endemicity. Other anopheles found in the region are: *A pharoensis, coustani, squamosus, marshalli, maculipalpis* and a few *christyi*.

The anophelinic density is influenced by two factors:

— the rainfall-

— the economic development of the area with its concomitant human occupation (creation of man-made breeding sites)-

In most of the cases transmission occurs inside the huts. *P. falciparum* is the predominant parasite.

2) DDT spraying has been in operation for four years. The health authorities assume the control. Only DDT insecticides complying with the WHO normes are used. Wall scrapings are tested according to the Alessandrini method. Fluctuations in the DDT residues are due to the fact that it is a « field » home-spraying: however well-trained a team may be, there remains none the less the difficulty of spraying exactly the required 2 g DDT slight differences in the machinery efficiency must also be taken into account when comparing the test results. Control is also extended to the number of treated huts.

3) After sic insecticidal traements the spray campaign i«s proving beneficial. The parasite rate measured on infants reached 48,99 per cent febore the campaign; it gradually decreased from 14,63 per cent after the first treatment to 13.23 per cent after the second one and to 2.50 per cent during the third phase of the eradiction. The risk of infection has also grown less: the *gambiae* and *funestus* indices show an abrupt decrease in hourly catches: 33.28 - 13.42 - 0.25.

The regular use of DDT in the Ruzizi area has not yet induced an anopheline resistance to residual insecticides. It is probably too premature to assert that previous contact with the larvae is indispensable to create resistant strains. Antilarval treatment has however been suspended in 1954. From a technical and economical point of view it is impossible to realise the larval eradication of all malaric vectors of the region.

The results could perhaps have been more striking still, but before concluding one must bear in mind:

— the geographical situation of the Ruzizi valley, surrounded by endemic areas without survey-

— the unstable character of the population-

— the difficulty to instil into the natives the correlation between breeding places and malaria-

When foci will be reduced and well located drug prophylaxis will be applied.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 1 - Gennaio 1958

CONSIDERAZIONI SULLA FREQUENZA DELLE PARASSITOSI INTESTINALI IN BASE ALL'ESAME COPROLOGICO DI 6.000 INDIVIDUI OSSERVATI PRESSO LA CLINICA MEDICA DI ROMA DAL 1947 AL 1956.

A. ROSSI-ESPAGNET e M. CAPONE (*)

Nel presente lavoro riferiamo i risultati degli esami parassitologici da noi effettuati nel corso degli ultimi anni su 6057 campioni di feci appartenenti ad altrettanti diversi individui. Tale indagine ci ha consentito di stabilire la incidenza delle singole parassitosi nella popolazione esaminata, sia nell'insieme, sia in rapporto ai singoli fattori individuali ed ambientali da noi presi in considerazione, e di valutare le possibilità ed i limiti dell'esame coprologico nella diagnostica delle parassitosi intestinali.

Trattandosi di un'indagine parassitologica coprologica i nostri dati si riferiscono, ovviamente, al solo esame macro e microscopico delle feci, prescindendo da sistemi di ricerca di altro tipo abitualmente impiegati collateralmente o a completamento dell'esame delle feci. A parte le sue limitazioni nei riguardi dell'ossiuriasi e della teniasi, l'esame coprologico, opportunamente eseguito, costituisce sempre il mezzo di gran lunga più importante per addivenire alla diagnosi di parassitosi intestinale ed è per questo che vi abbiamo fondato le presenti ricerche i cui risultati, anche in qualche eventuale aspetto negativo, conservano intatto il loro valore.

I campioni da noi esaminati appartenevano ad individui di ambo i sessi, di età compresa fra i 10 e gli 80 anni e di ogni classe sociale, ricoverati nelle corsie o visitati presso l'ambulatorio della nostra Clinica o inviati come esterni appositamente per l'esame coprologico. Essi provenivano in massima parte dalla città e dalla provincia di Roma, in parte dalle altre province del Lazio o da altre regioni dell'Italia centro-meridionale.

(*) *Istituto di Clinica Medica Generale e terapia medica dell'Università di Roma.* (Direttore: Prof. G. Di Guglielmo).

Va notato che solo una parte dei casi da noi esaminati presentavano disturbi eventualmente riferibili ad una parassitosi intestinale.

Per ogni campione della nostra casistica è stato eseguito un esame macroscopico preliminare ed un esame microscopico successivo dopo aver stemperato un'opportuna quantità di feci in soluzione fisiologica ed in liquido di Lugol doppio. Ci siamo valsi altresì dei metodi di arricchimento per le cisti di protozoi per le uova di elminti.

Tutti i campioni cui facciamo riferimento nel presente lavoro sono stati da noi personalmente esaminati ed osservati.

Dei 6057 casi esaminati, dei quali 3118 di sesso maschile e 2939 di sesso femminile, sono risultati parassitati 1087 soggetti pari al 17,9% così ripartiti: 497 maschi (15,9%) e 590 femmine (20,1%) (tab. 1 - I°).

La nostra casistica non comprende soggetti di età inferiore ai 10 anni essendo questi di pertinenza pediatrica. Come risulta dalla tabella 1-II, relativa a 2836 casi di cui 1328 maschi e 1500 femmine, l'incidenza delle parassitosi è stata massima nel secondo decennio di vita con andamento progressivamente decrescente nei decenni successivi ove si eccettui l'ottavo nel quale si è osservata una certa ripresa dei valori percentuali. L'incidenza nei due sessi è stata pressochè equivalente nel secondo decennio; nei decenni successivi essa è stata prevalente nelle femmine ed ha presentato una progressiva diminuzione in entrambi i sessi. Una lieve ripresa delle percentuali di infestazione si è avuta nel settimo decennio per i maschi e nell'ottavo per le femmine.

La nostra casistica è stata raccolta nel corso di complessivi 9 anni e precisamente dall'ultimo trimestre del 1947 al 3° trimestre incluso del 1956. Con relativa uniformità le percentuali di infestazione, rispetto ai casi esaminati nei vari anni, hanno oscillato tra 15,8% e 19,2% ove si eccettui l'anno 1952 nel quale ottenemmo una percentuale di 24,2%. Va notato però che in quell'anno, in occasione di un'indagine parassitologica svolta su una popolazione rurale residente alla periferia di Roma, convocammo presso la nostra Clinica un complesso di persone che risultarono quasi totalmente infestate. Togliendo infatti dal computo questo gruppo di individui, abbiamo ottenuto per l'anno 1952 una percentuale di 18,9% compresa cioè nei limiti di quelle relative agli altri anni (tab. 1-III).

Circa l'incidenza in rapporto al periodo dell'anno, nel 1° trimestre si è avuto il valore più elevato (18,2%) con massimi assoluti e relativi nei mesi di febbraio e marzo. Nel 2° trimestre la percentuale è stata del 17,7% con punta massima in maggio. Nel 3° trimestre si è avuta una percentuale del 15,6% con massimo in settembre; in questo trimestre e precisamente nel mese di agosto si è registrata la minima incidenza con 14,0%. Nel 4° trimestre la percentuale è stata del 16,7% con massimo in ottobre (17,7%) (tab. 1-IV).

Nei 1087 casi positivi abbiamo osservato 1300 parassiti, tenendo conto che

SPECIE PARASSITARIE — PROTOZOI / ELMINTI

I. — TOTALI GENERALI

	Totale casi esaminati	Totale casi parassitati	%	*Entamoeba coli* N.Casi	% assol.	% relat.	*Entamoeba histolytica* N.casi	% assol.	% relat.	*Endolimax nana* N.casi	% assol	% relat.	*Iodamoeba bütschlii* N.casi	% assol.	% relat	*Chilomastix mesnili* N.casi	% assol.	% relat.	*Trichomonas intestinalis* N.casi	% assol.	% relat.	*Giardia intestinalis* N.casi	% assol.	% relat.
TOTALI m	3118	497	15,9	112	3,6	22,5	36	1,1	7,2	6	0,2	1,2	19	0,6	3,8	15	0,5	3,0	7	0,2	1,4	113	3,6	22,7
TOTALI f	2939	590	20,1	101	3,4	17,1	21	0,7	3,6	2	0,07	0,3	26	0,9	4,4	10	0,3	1,7	5	0,2	0,8	119	4,0	20,2
TOTALI t	6057	1087	17,9	213	3,5	19,6	57	0,9	5,4	8	0,1	0,7	45	0,7	4,1	25	0,4	2,3	12	0,2	1,1	232	3,8	21,3

	Taenia saginata N.casi	% assol.	% relat.	*Hymenolepis nana* N.casi	% assol.	% relat.	*Ascaris lumbricoides* N.casi	% assol.	% relat.	*Enterobius vermicularis* N.casi	% assol.	% relat.	*Strongyloides stercoralis* N.casi	% assol.	% relat.	*Ancylostoma duodenale* N.casi	% assol.	% relat.	*Trichuris trichiura* N.casi	% assol.	% relat.	Parassiti associati N.casi	% assol.	% relat.
TOTALI m	18	0,6	3,6	9	0,3	1,8	102	3,3	20,5	9	0,3	1,8	2	0,06	0,4	29	0,9	5,8	110	3,5	22,1	72	2,3	14,5
TOTALI f	15	0,5	2,5	4	0,1	0,7	190	6,5	32,2	13	0,4	2,2	10	0,3	1,7	45	1,5	7,6	152	5,2	25,8	98	3,3	16,6
TOTALI t	33	0,5	3,0	13	0,2	1,2	292	4,8	26,9	22	0,4	2,0	12	0,2	1,1	74	1,2	6,8	262	4,3	24,1	170	2,8	15,6

II. — ETÀ (Valutazione su 2836 casi)

	Totale casi esaminati	Totale casi parassitati	%	*Entamoeba coli* N.Casi	% assol.	% relat.	*Entamoeba histolytica* N.casi	% assol.	% relat.	*Endolimax nana* N.casi	% assol	% relat.	*Iodamoeba bütschlii* N.casi	% assol.	% relat	*Chilomastix mesnili* N.casi	% assol.	% relat.	*Trichomonas intestinalis* N.casi	% assol.	% relat.	*Giardia intestinalis* N.casi	% assol.	% relat.
10-19	426	133	31,2	9	2,1	6,8	1	0,2	0.8	—	—	—	4	0,9	3,0	4	0,9	3,0	2	0,4	1,5	38	8,9	28,6
20-29	558	101	18,1	4	0,7	4,0	1	0,2	1,3		—	—	—	—	—	1	0,2	1,0	—	—	—	30	5,4	30,0
30-39	560	79	14,1	3	0,5	3,8	9	1,6	11,4	—	—	—	1	0,2	1,3	1	0,2	1,3	—	—	—	11	2,0	13,9
40-49	560	69	12,3	5	0,9	7,2	—	—	—	—	—	—	1	0,2	1,4	4	0,7	5,8	3	0,5	4,3	5	0,9	7,2
50-59	426	46	10,8	2	0,4	4,3	1	0,2	2,2	—	—	—	—	—	—	1	0,2	2,2	—	—	—	6	1,4	13,0
60-69	234	22	9,4	3	1,3	13,6	1	0,4	4,5	—	—	—	—	—	—	1	0,4	4,5	—	—	—	5	2,1	22,7
70-79	72	9	12,5	1	1,4	11,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2,8	22,2

	Taenia saginata N.casi	% assol.	% relat.	*Hymenolepis nana* N.casi	% assol.	% relat.	*Ascaris lumbricoides* N.casi	% assol.	% relat.	*Enterobius vermicularis* N.casi	% assol.	% relat.	*Strongyloides stercoralis* N.casi	% assol.	% relat.	*Ancylostoma duodenale* N.casi	% assol.	% relat.	*Trichuris trichiura* N.casi	% assol.	% relat.	Parassiti associati N.casi	% assol.	% relat.
10-19	1	0,2	0,8	3	0,7	2,2	51	12,0	38,3	3	0,7	2,2	2	0,4	1,5	30	7,0	22,6	41	9,6	30,8	34	8,0	25,6
20-29	4	0,7	4,0	3	0,5	3,0	30	5,4	30,0	3	0,5	3,0	2	0,4	2,0	18	3,2	18,0	31	5,6	31,0	23	4,1	23,0
30-39	4	0,7	5,1	-	—	—	31	5,5	39,2	4	0,7	5,1	2	0,4	2,5	1	0,2	1,3	29	5,2	36,7	13	2,3	16,5
40-49	1	0,2	1,4	—	—	—	28	5,0	40,0	—	—	—	—	—	—	11	2,0	15,9	23	4,1	33,3	11	2,0	15,9
50-59	1	0,2	2,2	—	—	—	20	4,7	43,5	—	—	—	1	0,2	2,2	4	0,9	8,7	19	4,5	41,3	9	2,1	19,6
60-69	—	—	—	—	—	—	10	4,3	45,5	—	—	—	—	—	—	1	0,4	4,5	6	2,6	27,3	3	1,3	13,6
70-79	—	—	—	—	—	—	1	1,4	11,1	—	—	—	—	—	—	1	1,4	11,1	5	6,9	55,6	1	1,4	11,1

III. — ANNO SOLARE (Valutazione su 6057 casi)

	Totale casi esaminati	Totale casi parassitati	%	*Entamoeba coli* N.Casi	% assol.	% relat.	*Entamoeba histolytica* N.casi	% assol.	% relat.	*Endolimax nana* N.casi	% assol	% relat.	*Iodamoeba bütschlii* N.casi	% assol.	% relat	*Chilomastix mesnili* N.casi	% assol.	% relat.	*Trichomonas intestinalis* N.casi	% assol.	% relat.	*Giardia intestinalis* N.casi	% assol.	% relat.
1947	173	32	18,5	9	5,2	29,5	9	5,2	29,5	1	0,6	3,1	—	—	—	1	0,6	3,1	—	—	—	3	1,7	9,4
1948	639	99	15,5	20	3,1	20,2	18	2,8	18,2	4	0,6	4,0	7	1,1	7,1	6	0,9	6,1	2	0,4	2,0	11	1,7	11,1
1949	713	137	19,2	35	4,9	25,5	11	1,5	8,0	1	0,1	7,3	1	0,1	7,3	1	0,1	7,3	—	—	—	20	2,8	14,6
1950	918	150	16,3	25	2,7	16,7	7	0,8	4,7	—	—	—	7	0,8	4,7	5	0,5	3,3	3	0,3	2,0	24	2,6	16,0
1951	765	136	17,8	32	4,2	23,5	4	0,5	2,9	—	—	—	7	0,9	5,1	3	0,4	2,2	—	—	—	24	3,1	17,6
1952	755	186	24,2	33	4,4	17,7	3	0,4	1,6	1	0,1	0,5	9	1,2	4,8	1	0,1	0.5	1	0,1	0,5	48	6,4	25,8
1953	626	113	18,0	10	1,6	8,8	1	0,2	0,9	1	0,2	0,9	5	0,8	4,4	3	0.5	2,7	1	0,2	0,9	29	4,6	25,7
1954	661	105	15,9	26	3,9	24,8	2	0,3	1,9	—	—	—	3	0,5	2,9	1	0,2	1,0	1	0,2	1,0	27	4,1	25,7
1955	462	75	16,2	11	2,4	14,7	1	0,2	1,3	—	—	—	4	0,9	5,3	2	0,4	2,7	—	—	—	31	6,7	41,3
1956	344	57	16,6	13	3,8	22,8	1	0,3	1,8	—	—	—	2	0,6	3,5	4	1,2	7,0	2	0,6	3,5	15	4,4	26,3

	Taenia saginata N.casi	% assol.	% relat.	*Hymenolepis nana* N.casi	% assol.	% relat.	*Ascaris lumbricoides* N.casi	% assol.	% relat.	*Enterobius vermicularis* N.casi	% assol.	% relat.	*Strongyloides stercoralis* N.casi	% assol.	% relat.	*Ancylostoma duodenale* N.casi	% assol.	% relat.	*Trichuris trichiura* N.casi	% assol.	% relat.	Parassiti associati N.casi	% assol.	% relat.
1947	1	0,6	3,1	1	0,6	3,1	2	1,2	6,3	1	0,6	3,1	—	—	—	—	—	—	7	4,0	2,2	4	2,3	1,3
1948	1	0,2	1,0	—	—	—	21	3,3	21,2	3	0,5	3,0	—	—	—	4	0,6	4,0	17	2,7	17,1	13	2,0	13,1
1949	5	0,7	3,6	6	0,8	4,4	40	5,6	29,2	3	0,4	2,2	1	0,1	7,3	5	0,7	3,6	31	4,3	22,6	18	2,5	13,1
1950	7	0,8	4,7	—	—	—	44	4,8	29,3	1	0,1	6,7	—	—	—	3	0,3	2,0	31	3,4	20,7	16	1,7	10,7
1951	4	0,5	2,9	2	0,3	1,5	34	4,4	25,0	2	0,3	1,5	3	0,4	2,2	4	0,5	2,9	46	6,0	33,8	18	2,4	13,2
1952	3	0,4	1,6	1	0,1	0,5	55	7,3	29,6	4	0,5	2,2	2	0,3	1,1	42	5,6	22,6	62	8,2	33,3	54	7,2	29,0
1953	6	1,0	5,3	2	0,3	1,8	38	6,1	33,6	4	0,6	3,5	1	0,2	0,9	3	0,5	2,7	29	4,6	25,7	20	3,2	17,7
1954	2	0,3	1,9	1	0,2	1,0	26	3,9	24,8	4	0,6	3,8	3	0,5	2,9	6	0,9	5,7	26	3,9	24,8	16	2,4	15,2
1955	3	0,6	4,0	—	—	—	23	5,0	30,1	—	—	—	1	0,2	1,3	5	1,1	6,7	19	4,1	25,3	6	1,3	8,0
1956	1	0,3	1,8	—	—	—	9	2,6	15.8	—	—	—	1	0,3	1,8	2	0,6	3,5	13	3,8	22,8	6	1,7	10,5

IV. — MESE (Valutazione su 6057 casi)

	Totale casi esaminati	Totale casi parassitati	%	*Entamoeba coli* N.Casi	% assol.	% relat.	*Entamoeba histolytica* N.casi	% assol.	% relat.	*Endolimax nana* N.casi	% assol	% relat.	*Iodamoeba bütschlii* N.casi	% assol.	% relat	*Chilomastix mesnili* N.casi	% assol.	% relat.	*Trichomonas intestinalis* N.casi	% assol.	% relat.	*Giardia intestinalis* N.casi	% assol.	% relat.
Gennaio	504	83	16,5	9	1,8	10,8	2	0,4	2,4		—	—	8	1,6	9,6	4	0,8	4,8	—	—	—	19	3,8	22,9
Febbraio	546	105	19,2	19	3,5	18,1	6	1,1	5,7	2	0,4	1,9	6	1,1	5,7	2	0,4	1,9	1	0,2	1,0	30	5,5	28,6
Marzo	583	111	19,0	18	3,1	16,2	5	0,9	4,5	—	—	—	2	0,3	1,8	2	0,3	1,8	1	0,2	0,9	33	5,7	29,7
Aprile	563	98	17,4	15	2,7	15,3	2	0,4	2,0	—	—	—	4	0,7	4,1	3	0,5	3,0	1	0,2	1,0	20	3,6	29,0
Maggio	672	123	18,3	25	3,7	20,3	5	0,7	4,1	1	0,2	0,8	5	0,7	4,1	3	0,4	2,4	—	—	—	20	3,0	16,3
Giugno	637	111	17,4	22	3,5	19,8	5	0,8	4,5	2	0,3	1,8	4	0,6	3,6	1	0,2	0,9	1	0,2	0,9	21	3,3	18,9
Luglio	561	86	15,3	25	4,4	29,1	6	1,1	7,0	1	0,2	1,2	3	0,5	3,5	2	0,4	2,4	2	0,4	2,4	8	1,4	9,3
Agosto	215	30	14,0	8	3,7	26,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0,5	3,3	1	0,5	3,3	3	1,4	10,9
Settembre	423	76	17,6	22	5,1	28,9	2	0,5	2,6	1	0,2	1,3	5	1,2	6,6	3	0,7	3,9	—	—	—	14	3,2	4,4
Ottobre	566	100	17,7	17	3,0	16,8	8	1,4	8,0	1	0,2	1,0	2	0,4	2,0	1	0,2	1.0	1	0,2	1,0	25	4,4	26,0
Novembre	576	88	15,3	20	3,5	22,7	7	1,2	8,0	1	0,2	1,1	2	0,3	2,2	3	0,5	3,4	1	0,2	1,1	12	2,1	18,6
Dicembre	441	76	17,2	13	2,9	17,1	10	2,3	13,2	—	—	—	2	0,5	2,6	2	0,5	2,6	1	0,2	1,3	15	3,4	19,7

	Taenia saginata N.casi	% assol.	% relat.	*Hymenolepis nana* N.casi	% assol.	% relat.	*Ascaris lumbricoides* N.casi	% assol.	% relat.	*Enterobius vermicularis* N.casi	% assol.	% relat.	*Strongyloides stercoralis* N.casi	% assol.	% relat.	*Ancylostoma duodenale* N.casi	% assol.	% relat.	*Trichuris trichiura* N.casi	% assol.	% relat.	Parassiti associati N.casi	% assol.	% relat.
Gennaio	2	0,4	1,2	1	0,2	1,2	29	5,6	34,9	1	0,2	1,2	—	—	—	1	0,2	1,2	18	3,6	21,7	9	1,8	10,8
Febbraio	4	0,7	3,8	1	0,2	1,0	32	5,9	30,5	5	0,9	4,8	1	0,2	1,0	4	0,7	3,8	16	2,9	15,2	21	3,8	20,0
Marzo	5	0,9	4,5	—	—	—	27	4,6	24,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	28	4,8	25,2	9	1,5	8,1
Aprile	2	0,4	2,0	1	0,2	1,0	28	5,0	26,7	—	—	—	—	—	—	10	1,8	10,0	18	3,2	18,0	6	1,1	6,0
Maggio	1	0,2	0,8	—	—	—	47	7,0	38,2	5	0,7	4,1	1	0,2	0,8	35	5,2	28,5	41	6,1	33,3	41	6,1	33,3
Giugno	3	0,5	2,7	1	0,2	0,9	21	3,3	18,9	2	0,3	1,8	4	0,6	3,6	7	1,1	6,3	31	4,9	27,9	18	2,8	16,2
Luglio	2	0,4	2,4	2	0,4	2,4	21	3,7	24,4	3	0,5	3,5	—	—	—	1	0,2	1,2	17	3,0	19,8	15	2,7	17,4
Agosto	3	1,4	10,0	—	—	—	8	3,7	26,7	—	—	—	1	0,5	3,3	—		—	7	3,3	23,3	2	0,9	6,7
Settembre	1	0,2	1,3	2	0,5	2,6	18	4,2	23,7	1	0,2	1,3	5	1,2	6,6	3	0,7	3,9	15	3,5	19,7	12	2,8	15,8
Ottobre	4	0,7	4,0	3	0,5	3,0	22	3,9	22,0	1	0,2	1,0	—	—	—	3	0,5	3,0	21	3,7	21,0	8	1,4	8,0
Novembre	2	0,3	2,2	2	0,3	2,2	18	3,1	20,5	2	0,3	2,2	—	—	—	2	0.3	2,2	27	4,7	30,7	11	1,9	12,5
Dicembre	3	0,7	3,9	—	—	—	18	4,2	23,7	1	0,2	1,3	—	—	—	6	1,4	7.9	18	4,0	27,7	14	3,2	18,4

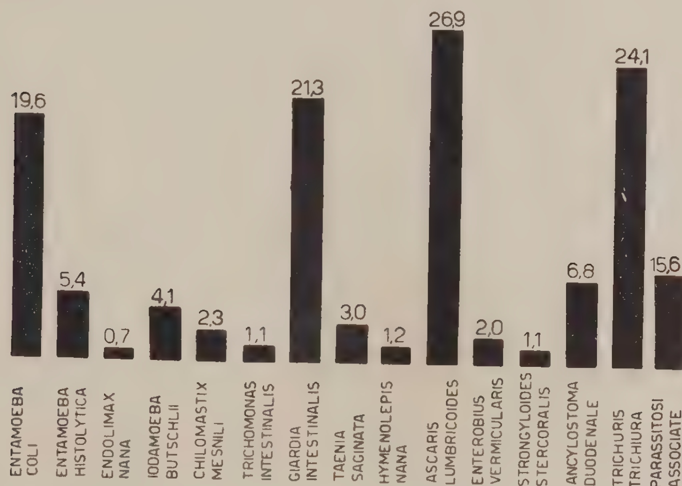
in 170 soggetti era presente più di una parassitosi. Abbiamo riscontrato 14 specie parassitarie 7 di protozoi e 7 di elminti. Esse sono le seguenti:

Protozoi.
Entamoeba coli
Entamoeba histolytica
Endolimax nana
Iodamoeba bütschlii
Chilomastix mesnili
Trichomonas intestinalis
Giardia intestinalis

Elminti.
Taenia saginata
Hymenolepis nana
Ascaris lumbricoides
Enterobius vermicularis
Strongyloides stercoralis
Ancylostoma duodenale
Trichuris trichiura

Le relative numerosità e le percentuali di incidenza assolute e relative sono riportate nella tabella 1-I, e graf. 1.

Da essa si rileva anzitutto la maggior numerosità degli elminti rispetto ai protozoi e cioè, su un totale di 1300 parassiti, abbiamo riscontrato 592 protozoi (45,5%) e 708 elminti (54,5%).



Graf. 1.

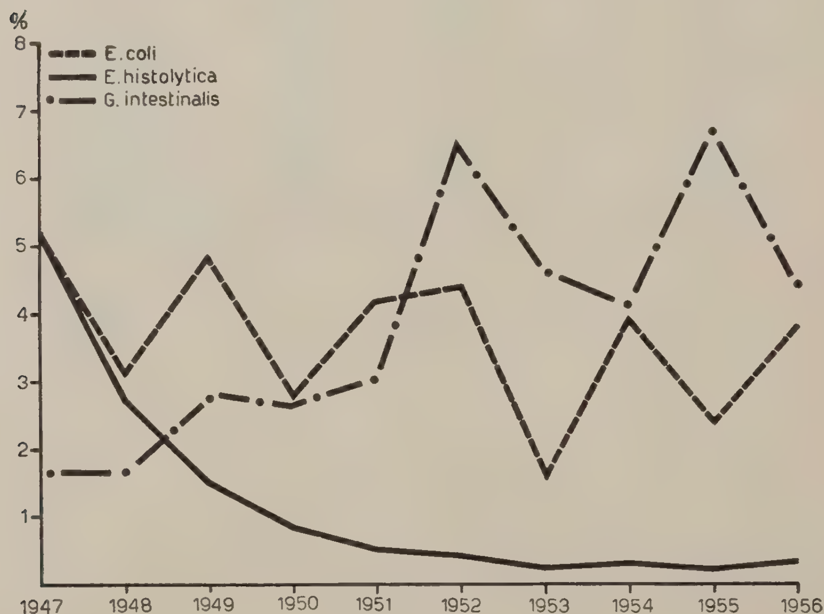
Nell'ambito delle protozoosi hanno inciso maggiormente, sia in senso assoluto che relativo, *G. intestinalis* (3,8% e 21,3%) (1) ed *E. coli* (3,5% e 19,6%). Fra le elmintiasi sono state più frequentemente repertate *A. lumbricoides* (4,8% e 26,9%) e *T. trichiura* (4,3% e 24,1%). Per le altre percentuali consultare la tabella 1-I.

(1) Il primo valore esprime la percentuale assoluta rispetto ai casi esaminati, il secondo valore esprime la percentuale relativa ai casi parassitati.

In rapporto al sesso si è riscontrato nelle femmine un andamento analogo, mentre nei maschi abbiamo notato una uguale incidenza di *E. coli* e *G. intestinalis,* e una maggior incidenza di *T. trichiura.* (tab. 1-I).

Il comportamento delle singole parassitosi nei vari decenni di età (dal 2° all'8°) è riportato nella tabella 1-II. In essa si nota che, qualunque sia la specie considerata i decenni 2° 3° e 4° sono i più colpiti con prevalenza di *E. coli* e *G. intestinalis* fra i protozoi e di *A. lumbricoides* e *T. trichiura* fra gli elminti. Però questi parassiti incidono largamente anche negli altri decenni. Anche per *A. duodenale,* fra gli elminti, si sono avute elevate percentuali soprattutto nel 2°, nel 3° e nel 5° decennio di vita.

La frequenza delle singole parassitosi, rispetto al totale dei casi esaminati nei vari anni solari dal 1947 al 1956, è stata pressochè uniforme per la maggior parte delle specie riscontrate. Fanno però largamente eccezione *E. histolytica, G. intestinalis* e *A. duodenale.* L'incidenza della prima relativamente elevata negli anni 1947 e '48, è andata poi gradualmente diminuendo fino al 1956 .Viceversa *G. intestinalis* ha manifestato un progressivo aumento con cuspidi più elevate negli anni 1952 e 1955 .Ciò in contrasto con *E. coli* che, pur essendo con la *G. intestinalis* il protozoo di più frequente riscontro, si dissocia da questa per l'andamento abbastanza uniforme della sua incidenza nei vari anni (tab. 1-III e graf. 2). *A. duodenale,* infine, che nella no-



Graf. 2.

stra casistica occupa fra le elmintiasi il terzo posto per frequenza, ha presentato una incidenza massima nel 1952 per le ragioni già esposte in altra parte del presente lavoro.

Fra i protozoi, inoltre, *G. intestinalis* figura maggiormente nei mesi invernali e primaverili, *E. coli* nei mesi estivi ed autunnali. Questo comportamento appare sia considerando le percentuali assolute che quelle relative.

Per gli altri protozoi ed elminti non si è avuto nei vari mesi dell'anno un comportamento particolarmente indicativo.

Entamoeba coli: è uno dei protozoi di più frequente riscontro. Noi l'abbiamo repertata 213 volte, vale a dire nel 3,5% di tutti i casi esaminati e nel 19,6% dei soli casi parassitati. Nella nostra casistica è risultata lievemente più frequente nei maschi, e negli individui al di sopra dei 40 anni. La distribuzione nei vari anni è stata abbastanza uniforme e comunque senza un andamento particolare. Pur incidendo largamente in tutti i mesi, è risultata prevalente sugli altri protozoi nei mesi estivi ed autunnali. Frequente la sua associazione con altri parassiti (tab. 2).

Entamoeba histolytica: ne abbiamo osservati 57 casi per una percentuale del 0,9% di tutti i casi esaminati e del 5,4% dei casi parassitati. L'incidenza è stata maggiore nel sesso maschile e soprattutto in individui fra i 30 e i 40 anni. Particolarmente interessante l'andamento dell'infezione nei vari anni solari poichè dall'incidenza relativamente elevata degli anni 1947 e 1948 si è gradualmente discesi a cifre percentuali minime negli ultimi anni (vedi tab. 1-III e grafico 1). Ciò probabilmente è in rapporto con il diminuito rifornimento di casi parassitati dai territori africani, ove tale parassitosi incide largamente anche sulla popolazione europea. Rispetto ai periodi dell'anno si è osservata una maggiore frequenza nei mesi di ottobre, novembre e dicembre. L'associazione di più frequente riscontro è stata quella con *E. coli* (tab. 2).

Endolimax nana: è stata riscontrata 8 volte nella percentuale assoluta del 0,1% e relativa del 0,7%.

Iodamoeba bütschlii: nella nostra casistica figura 45 volte (0,7% e 4,1%) prevalentemente in individui di sesso femminile ed appartenenti al 2° decennio di vita.

Chilomastix mesnili e *Trichomonas intestinalis*: il primo è stato repertato 25 volte e cioè nel 0,4% dei casi esaminati e nel 2,3% di quelli parassitati; il secondo è stato osservato 15 volte e cioè nella percentuale assoluta di 0,2% e relativa del 1,1%.

Giardia intestinalis: è, con *E. coli,* il protozoo di più frequente riscontro. E' stato osservato, per lo più in forma cistica, in 232 casi pari al 3,8% dei casi esaminati ed al 21,3% di quelli parassitati. Ad incidenza pressochè eguale nel sesso maschile e femminile, *G. intestinalis* è stata riscontrata soprattutto nel 2° e 3° decennio di vita pur essendo frequentemente repertabile a tutte le età. Circa la distribuzione nei vari anni cui si riferisce la nostra casistica,

TABELLA 2.

	N. ordine	N. casi	*Entamoeba coli*	*Entamoeba histolytica*	*Endolimax nana*	*Iodamoeba bütschli*	*Chilomastix mesnili*	*Trichomonas intestinalis*	*Giardia intestinalis*	*Taenia saginata*	*Hymenolepis nana*	*Ascaris lumbricoides*	*Enterobius vermicularis*	*Strongyloides stercoralis*	*Ancylostoma duodenale*	*Trichuris trichiura*
2 parassiti	1	9	◆	◆												
	2	1	◆		◆											
	3	9	◆			◆										
	4	2	◆				◆									
	5	6	◆						◆							
	6	4	◆									◆				
	7	8	◆													◆
	8	1	◆									◆				
	9	3	◆												◆	
	10	1		◆											◆	
	11	1		◆						◆						
	12	1				◆										◆
	13	1				◆									◆	
	14	10							◆			◆				
	15	3							◆							◆
	16	1							◆					◆		
	17	4							◆						◆	
	18	1							◆		◆					
	19	48										◆				◆
	20	1										◆	◆			
	21	6										◆			◆	
	22	1								◆		◆				
	23	1												◆		◆
	24	8													◆	◆
	25	1												◆	◆	
	26	1								◆	◆					
	27	1		◆								◆				
3 parassiti	1	1	◆	◆	◆											
	2	1	◆	◆		◆										
	3	1	◆	◆			◆									
	4	1	◆	◆					◆							
	5	1	◆		◆				◆							
	6	2	◆			◆		◆								
	7	1	◆			◆							◆			
	8	3	◆									◆				◆
	9	1	◆								◆	◆				
	10	2	◆									◆		◆		
	11	1	◆										◆			◆
	12	2	◆												◆	◆
	13	1	◆										◆		◆	
	14	1		◆								◆	◆			
	15	1				◆									◆	◆
	16	1				◆			◆							◆
	17	2				◆						◆				◆
	18	1										◆	◆			◆
	19	2										◆			◆	◆
	20	1											◆		◆	◆
	21	1												◆	◆	◆
	22	1								◆			◆	◆		
4 parassiti	1	1				◆	◆		◆				◆			
	2	1				◆			◆						◆	◆
	3	1							◆			◆			◆	◆
5 parassiti	1	1	◆			◆						◆			◆	◆
	2	1	◆						◆			◆			◆	◆
	3	1			◆				◆			◆			◆	◆

abbiamo notato un aumento graduale di incidenza dal 1947 al 1956 con punte massime negli anni 1952 e 1955 (tab. 1-III e grafico 1). Pur essendo reperibile in tutti i periodi dell'anno, è risultata più frequente nei mesi invernali e primaverili. Frequente è stata la sua associazione con altri parassiti e particolarmente con *A. lumbricoides* (tab. 2).

Per quanto le cisti di questo protozoo siano per lo più presenti in grande abbondanza nelle feci, tuttavia si è notata a volte una grande differenza nel numero delle stesse esaminando campioni di feci dello stesso soggetto in periodi diversi ed a prescindere da qualsiasi trattamento.

Questo comportamento del parassita cui spesso fa riscontro un andamento ricorrente della sintomatologia clinica, deve indurre ad un'accurata e tenace ricerca del protozoo utilizzando anche i metodi di arricchimento.

Taenia saginata: ne abbiamo osservati 33 casi pari ad una percentuale assoluta del 0,5% e relativa del 3,0% con lieve prevalenza nei maschi rispetto alle femmine. Anche per questo parassita, come per *E. vermicularis*, i dati rilevabili mediante esame coprologico non sono indicativi essendo il reperto nelle feci delle relative uova del tutto occasionale.

Hymenolepis nana; ne abbiamo osservati 13 casi (0,2% e 1,2%) di cui 9 maschi e 4 femmine. Nella nostra casistica suddivisa per decenni i casi che vi figurano appartengono tutti all'età compresa fra 10 e 29 anni.

Ascaris lumbricoides: di tutti i parassiti da noi repertati, *A. lumbricoides* è stato di più frequente riscontro sia in percentuale assoluta (4,8%) che relativa (26,9%). Esso è stato repertato 292 volte di cui 102 volte in maschi e 190 volte nelle femmine nelle rispettive percentuali assolute di 3,3 e 6,5%: l'incidenza è stata perciò maggiore nel sesso femminile. Tutte le età da noi considerate, sono abbastanza uniformemente colpite e non si è notata in alcun anno nè in alcun mese una particolare incidenza del parassita. *A. lumbricoides* è la specie che è stata più frequentemente rinvenuta associata con altri parassiti soprattutto con *T. trichiura* e con *G. intestinalis* (tab. 2).

Enterobius vermicularis: i pochi casi da noi repertati documentano che l'esame microscopico delle feci, anche se accompagnato da un accurato esame macroscopico, è decisamente insufficente nel rilievo di questa parassitosi. La reale incidenza dell'infestazione da *E. vermicularis* è infatti notevolmente superiore a quanto non riveli l'indagine coprologica. Altri sistemi, ad esempio il metodo di Graham, sono più adatti allo scopo. Facciamo qui osservare che questa parassitosi, a differenza di quasi tutte le altre, interessa anche le classi sociali più abbienti rivestendo spesso carattere familiare.

Strongyloides stercoralis: è stato repertato 12 volte (0,2% e 1,1%) e precisamente 2 volte nei maschi e 10 volte nelle femmine. Da noi è stato osservato soprattutto in individui di età compresa fra 10 e 39 anni.

Ancylostoma duodenale: nella nostra casistica l'infestazione da *A. duodenale* occupa, tra le elmintiasi, il terzo posto in ordine di frequenza. L'abbia-

TABELLA 3.

	Comune di Roma			Provincia di Roma			Provincia di Frosinone			Provincia di Latina			Provincia di Rieti			Provincia di Viterbo		
	m.	f.	t.	m.	f.	t.	m.	f.	t.	m.	f.	t.	m.	f.	t.	m.	f.	t.
Casi esaminati	2047	1940	3987	459	473	932	40	57	97	33	40	73	32	34	66	27	37	64
Casi parassitati	315	308	623	99	134	233	8	19	27	7	5	12	7	14	21	1	8	9
%	**15,4**	**15,9**	**15,5**	**21,6**	**28,3**	**25,3**	**20,0**	**33,3**	**27,8**	**21,2**	**12,5**	**16,4**	**21,9**	**41,2**	**31,8**	**3,7**	**21,6**	**14,1**

mo riscontrata 74 volte (1,2% e 6,8%), 29 volte nei maschi e 45 volte nelle femmine. L'incidenza più elevata la si è riscontrata nel 2° e nel 3° decennio di vita. Dei vari anni cui si riferisce la nostra casistica, il 1952 ha presentato la più elevata percentuale di infestati. Questo dato però non esprime un aumento effettivo della parassitosi in quell'anno, in quanto i valori da noi riscontrati sono stati influenzati dai numerosi soggetti appartenenti a dei focolai di anchilostomiasi da noi individuati e descritti nel 1952.

Le cifre da noi riportate, se riproducono con sufficiente precisione il ricorrere dell'infestazione da *A. duodenale* nella casistica qui esaminata, sono tuttavia ben lungi dal documentare la effettiva diffusione di questa parassitosi che, non a torto, è considerata una delle più gravi fra quelle esistenti nei nostri climi. Nelle statistiche parassitologiche di massa l'anchilostomiasi occupa un posto di importanza sicuramente inferiore a quella che sembra essere la sua effettiva diffusione. Com'è noto questa parassitosi è oggi soprattutto diffusa fra le popolazioni rurali ed il contadino, che con i suoi familiari ne è portatore, è estremamente restio a farsi esaminare un po' per ignoranza, un po' perchè considera con scetticismo o con timore le inevitabili misure terapeutiche e addirittura con ostilità i procedimenti di bonifica del terreno che ritiene dannosi per il raccolto.

Ciononostante l'indagine statistica contribuisce ad orientare l'attenzione degli studiosi verso questa terribile parassitosi la cui reale incidenza potrà essere poi meglio chiarita da indagini specificamente indirizzate.

La sua associazione con altri parassiti è frequente (tab. 2).

Trichuris trichiura: anche questo parassita ha dimostrato un'elevata incidenza, essendo stato repertato 262 volte (4,3% e 24,1%) e precisamente 110 volte nei maschi, nei quali supera in frequenza ogni altra parassitosi, e 152 volte nelle femmine. Dall'insieme dei dati si desume che questa è, fra le specie da noi repertate, la seconda in ordine di frequenza. Anche per *T. trichiura* non si rileva un andamento particolare nelle varie età, nei vari anni e nei vari mesi. E' molto frequentemente associato ad altri parassiti e sopratutto ad *A. lumbricoides* (tab. 2).

Parassitosi associate.

Su 6057 casi esaminati abbiamo avuto 170 casi (2,8%) di parassitosi multiple e precisamente 72 maschi (2,3%) e 98 femmine (3,3%). Rispetto al totale dei casi parassitati (1087) la percentuale è stata di 15,6% (tab. 1-I). Anche in questo gruppo l'incidenza nelle femmine è risultata maggiore (54,7%). L'età in cui le parassitosi multiple sono più frequenti è il secondo decennio con andamento gradualmente decrescente nei decenni successivi (valutazione su 2836 casi). Si è notata inoltre una maggiore incidenza negli anni 1952 e 1953 e nei mesi di maggio e febbraio.

Nei 170 casi di questo gruppo abbiamo osservato 134 volte (78,7%) 2 parassiti, 29 volte 3 parassiti (17,1%), 3 volte 4 parassiti (1,8%), e 4 volte 5 parassiti (2,4%). L'associazione di gran lunga più frequente è stata *A. lumbricoides* + *T. trichiura* come risulta dalla tabella 2 in cui sono riportate anche le altre associazioni.

Incidenza delle parassitosi nel comune e nella provincia di Roma.

La nostra casistica comprende: 3982 soggetti abituamente residenti nel Comune di Roma, 937 nella provincia di Roma, 300 nelle altre province del Lazio, 60 nell'Umbria, 172 nell'Abruzzo, 65 nelle Marche, 199 nella Calabria, 112 nelle Puglie e 30 casi la cui provenienza non ci è stato possibile precisare. In complesso perciò su 6057 individui esaminati 5219 risiedevano nelle varie province del Lazio essendo ovviamente in netta prevalenza quelli di Roma e provincia. Limitiamo perciò il nostro esame al Lazio, troppo grande essendo la differenza di numerosità per poter stabilire confronti fra questa e le altre regioni. Diremo solo che, fra queste ultime, come d'altra parte è già noto, la Calabria presenta un'incidenza di parassitosi particolarmente elevata, prevalendovi le stesse specie parassitarie che risultano più numerose nella rimanente casistica; fra esse però merita di essere segnalata la notevole diffusione dell'anchilostomiasi.

Per i casi provenienti dal comune e dalla provincia di Roma, le percentuali di incidenza delle varie parassitosi rispetto al sesso, all'età, all'anno solare ed al mese sono le stesse da noi già segnalate per l'intera casistica.

Considerando invece in parallelo la diffusione delle parassitosi nel comune e nella provincia di Roma, notiamo, per il primo una percentuale del 15,5% e per la seconda del 25,3%. Nelle altre province del Lazio, le cui numerosità sono però molto inferiori, si è avuta un'incidenza del 27,8% per Frosinone, del 16,4% per Latina, del 31,8% per Rieti e del 14,1% per Viterbo (tabella 3).

Conclusioni

La nostra indagine parassitologica si fonda sui risultati dell'esame coprologico mediante osservazione microscopica diretta eseguita nelle più opportune condizioni e spesso integrata dalle metodiche di arricchimento.

La casistica comprende individui adulti e comunque di età superiore al 10° anno. Le percentuali di positività da noi dimostrate possono considerarsi discretamente elevate, con incidenza maggiore nelle femmine e nel secondo decennio di vita.

Per *E. histolytica* abbiamo notato una graduale diminuzione del numero di positività negli ultimi tempi, viceversa vi è stato un aumento, anche se non altrettanto marcato, per l'infezione da *G. intestinalis*. Le altre parassitosi

hanno presentato una distribuzione pressochè indifferente in rapporto ai 9 anni da noi presi in considerazione.

G. intestinalis nella nostra casistica ha inciso maggiormente nei mesi invernali, *E. coli* nei mesi estivi: l'un e l'altro parassita sono tuttavia frequenti anche negli altri mesi. Per le altre parassitosi non siamo riusciti a sorprendere un particolare andamento stagionale.

Per alcune parassitosi (*T. saginata, E. vermicularis*), il cui reperto nelle feci è puramente occasionale, le cifre da noi ottenute non riproducono la effettiva incidenza nella popolazione, al contrario esse documentano la limitazione dell'indagine coprologica nel loro accertamento. Per il resto va particolarmente segnalata fra i protozoi la diffusione di *G. intestinalis* e fra gli elminti quella di *A. lumbricoides* e di *A. duodenale*. Queste parassitosi infatti, a differenza di altre, che pur incidono largamente nella popolazione (*E. coli, T. trichiura*), si accompagnano quasi sempre, nei soggetti portatori, a disturbi più o meno marcati e possono, non raramente, essere fonte di gravissime sintomatologie potenzialmente capaci di evolvere anche fino a morte qualora non si intervenga con l'opportuna terapia, (ad es. anchilostomiasi). Ma anche laddove tali conseguenze non si verificano, la lunga permanenza del parassita nell'organismo può condurre e conduce ad uno stato di cronica malattia e di danno organico e funzionale capace poi di evolvere per proprio conto anche dopo la tardiva soppressione del parassita che lo ha provocato..

Le statistiche parassitologiche pertanto, a parte i loro interessanti aspetti puramente biologici, si prefiggono appunto il fine di richiamare l'attenzione sull'entità e sulle modalità di diffusione delle parassitosi in funzione dei danni fisici e sociali che queste comportano. Bonificare delle popolazioni infestate significa risolvere un complesso di problemi capaci di influire favorevolmente non solo sulla loro efficienza fisica, ma anche sulle loro condizioni economiche e sociali. Purtroppo ancor oggi, nonostante gli sforzi di enti e di individui, ben poco sappiamo sulla reale diffusione delle malattie da parassiti e particolarmente di alcune. Ciò è in rapporto anche con il fatto che il controllo parassitologico di una data regione presenta aspetti dinamici che obbligano ad una indagine coordinata e ripetuta nel tempo. E' noto come gli eventi bellici possano influire modificando la carta parassitologica di un dato paese. Così dicasi per gli eventi politici e noi nella nostra pur limitata casistica ne abbiamo un esempio a proposito di *E. histolytica*. Particolari necessità di lavoro possono richiedere lo spostamento di interi nuclei familiari infestati da zone ove una parassitosi è endemica e trapiantarla in un'altra precedentemente indenne: i focolai di anchilostomiasi esistenti nel Comune di Roma sono in gran parte originari da altre regioni dell'Italia centro-meridionale e particolarmente dalla Campania, dalle Marche e dall'Abruzzo. Il costituirsi di comunità formate da individui di condizione e provenienza eterogenea può favorire la diffusione di quelle parassitosi per le quali è possibile un con-

tagio diretto: non ci risulta infatti che nei collegi, nelle caserme, nelle colonie marine e montane, ecc. vengano effettuate, salvo rare eccezioni, opportune indagini ed efficienti controlli aventi finalità profilattiche.

In 170 casi (2,8%) abbiamo riscontrato più di un parassita nello stesso soggetto. L'associazione più frequente è stata quella di *A. lumbricoides* con *T. trichiura* il che può derivare anche dalla maggior diffusione di queste due parassitosi. Per quanto, riguarda le infestazioni multiple a 3, 4 e 5 parassiti queste sono risultate appannaggio quasi esclusivo delle classi meno abbienti e in particolare degli individui di giovane età.

Circa la provenienza degli individui da noi esaminati notiamo che il maggior numero è fornito dal comune e dalla provincia di Roma. L'incidenza di parassitosi è stata maggiore per i casi provenienti dalla provincia. Delle altre province del Lazio sono risultate più interessate quelle di Rieti e Frosinone. Non è stato possibile stabilire un confronto del Lazio con le altre regioni dell'Italia centro-meridionale per le troppo grandi differenze di numerosità fra esse esistenti.

RIASSUNTO

Gli AA. riferiscono sulla frequenza delle parassitosi intestinali in 6.057 individui dedotta in base ai risultati dell'esame coprologico macroscopico e microscopico eseguito nelle più opportune condizioni.

La valutazione delle percentuali di incidenza è stata effettuata, oltre che sul totale della casistica, anche in base al sesso, all'età ed alla provenienza dal comune o dalla provincia di Roma e dalle altre provincie del Lazio.

Poichè gli esami coprologici, cui il presente lavoro si riferisce, sono stati eseguiti dal 1947 al 1956 gli AA. precisano l'incidenza in rapporto all'anno solare ed al mese.

Prendendo poi in considerazione le singole parassitosi è stato esaminato il comportamento di ciascuna in rapporto ai suddetti fattori inviduali ed ambientali. E' infine riportata la frequenza ed i tipi più comuni di associazioni parassitarie.

SUMMARY

The AA. illustrate the frequency of intestinal parasitoses in 6057 individuals, deduced from the results of the macroscopic and microscopic coprological investigation conduted in the most suitable conditions. The evaluation of the percentages of incidence was made not only on the basis of the total number of cases, but also by taking into account the age and sex of the individuals, the municipality of origin, and the fact that they belonged to the province of Rome, as well as to other provinces of Latium.

Since the coprological investigations were conducted during the period 1947-1956, the AA. specify the incidence in relation to both solar year and month.

The individual parasitoses are then taken into consideration, and the behaviour of each one is examined with respect to the above mentioned individual and environmental factors. Lastly the frequency and the most common types of polyparasitic associations are described.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 1 - Gennaio 1958

INFECTIONS UNISEXUÉES ET POSSIBILITÉ DE GUÉRISON DE BILHARZIOSE À *S. MANSONI* CHEZ LA SOURIS

E. LAGRANGE (*)

Ayant observé autrefois la guérison spontanée de cobayes infestés de bilharziose (1), j'ai cherché à obtenir le même résultat chez la souris en la soumettant à des infestations provoquées par les *Schistosoma* d'un seul sexe, provenant d'un seul planorbe.

Pour faire le diagnostic de la bilharziose, on dispose de 3 procédés d'efficacité croissante:

1. — examen microscopique direct ou après concentration des matières fécales;

2. — épreuve d'éclosion des oeufs des déjections ou des organes qui permet d'opérer sur des quantités importantes de matières;

3. — enfin à l'autopsie, recherche des adultes, des oeufs et du pigment dans le foie et les vaisseaux porte et mésentériques surtout, soit par perfusion en partant de la veine cave inférieure, soit plus simplement par écrasement du foie ou de l'intestin entre deux plaques de verre. Mes planorbes sont exposés à de multiples miracidiums. Toute autopsie comporte un examen à la loupe et au microscope du foie frais écrasé et du mésentère.

J'ai pu autrefois vérifier chez la souris la guérison par traitement au Miracil où il ne restait comme traces de l'infestation que du pigment noir dans le foie. Les oeufs, y compris la coquille et l'éperon, disparaissent. Jamais je n'ai observé de guérison spontanée chez la souris normalement infectée. Par contre, la guérison spontanée se fait régulièrement chez le cobaye après quelques mois. On n'y trouve jamais d'oeufs dans les matières fécales, à aucun moment de l'infection.

Voici les résultats les plus intéressants de mes expériences poursuivies depuis 3 ans, avec la même souche, la seule que je possède. (Souche Vogel).

(*) *Fondation médicale Reine Elisabeth, Jette - Bruxelles.*

I. — Le 1er août 1955, 4 souris blanches sont exposées aux cercaires abondantes d'un planorbe infesté. 3 d'entre elles sont mortes aprés 6 et 10 semaines sans autopsie.

La 4e est examinée 2 jours de suite le 8 et le 9 décembre. L'examen direct et l'épreuve d'éclosion sont 2 fois négatives. Mort le 16 décembre. Le foie est apparemment normal, brun, lisse et luisant. Dans le foie, je trouve 7 femelles immatures. Pas trace d'oeufs. 3 petits foyers de pigment noir. 1 femelle dans le mésentère. Mort *par hémorragie coecale à défaut d'oeufs.*

II. — Le 8 septembre 1955, 5 souris sont infestées légèrement avec les cercaires d'un planorbe. Le 10 décembre, toutes sont positives (examen direct des fèces) 4 d'entre elles meurent d'hémorragie intestinale le 28.12.55, le 19.1.56, le 24.1.56, et le 17.2.56.

Chez l'une d'elles, du 24 janvier, pas trace d'oeufs dans le foie, même par épreuve d'éclosion. On a cependant trouvé 2 mâles et 1 femelle à l'autopsie dans le foie.

La dernière, morte en février, présente des oeufs d'apparence normale; aucun n'a éclos à l'épreuve d'éclosion tout comme cela s'était produit plusieurs fois les jours précédents, à l'examen des matières fécales.

La 5e souris est restée positive jusqu'à sa mort survenue le 27.7.56, soit plus de 10 mois après l'infestation. Le foie est gris, bourré de pigment et d'oeufs vivants. Hémorragie coecale et exsudat péritonéal hémorragique. Il a été *impossible de déceler le moindre adulte.*

III. — Le 15 et le 19 décembre 1955, 4 souris mâles sont infestées de quelques cercaires d'un planorbe infesté. Elles sont examinées périodiquement avec résultat négatif, ce qui n'est pas surprenant, puisqu'elles n'ont pu être touchées que par les parasites d'un seul mollusque. Une meurt le 18 juin. L'examen est totalement négatif. Ni parasites, ni oeufs, ni pigment, foie intact. Le 20 juin, les 3 autres sont sacrifiées. Autopsie complèment négative: ni adultes, ni oeufs, ni pigment.

Peut-on parler de guérison d'une infection unisexuée? Les expériences suivantes me font croire que oui. (*)

IV. — 10 souris blanches jeunes (elles pèsent ensemble 120 grammes) sont baignées le 20 juin 1956 et les 4 jours suivants avec les cercaires issues d'un seul planorbe soit au total environ 77 cercaires par tête en moyenne.

Les 24 et 25 juillet, 4 souris grises adultes reçoivent deux bains avec les cercaires du même planorbe, soit environ 300 cercaires au total. Une meurt six jours après.

(*) Les souris exposée à l'infestation par les cercaires s'infestent à 100%.

— Le 10 août, je sacrifie une souris blanche: 38 mâles, sauf 5, tous dans le foie qui semble en parfait état; on y trouve cependant un peu de pigment. Pas d'oeufs. Mâles possédant des testicules nets.

— id. une deuxième souris; environ 50 mâles dont 12 dans le système mésentérique et 1 femelle vivante et 1 oeuf mûr dans le foie. Cette souris a un foie grisâtre qui contient du pigment.

— le 11 août, une troisième souris blanche sacrifiée: foie gris avec pigment, oeufs peu abondants: 49 mâles et 2 femelles. Dans le mésentère, 26 mâles et 2 femelles.

— le 13 aout, 4e souris sacrifiée; dans le foie, 30 mâles, pigment, très rares oeufs. Dans le mésentère, 26 mâles, 1 femelle. Dans la muqueuse intestinale, rares oeufs.

— le 13 âout, 5e souris sacrifiée. Dans le foie macroscopiquement sain, 37 mâles, pigment, très rares oeufs. Dans le mésentère, 35 mâles. Pas vu de femelles.

— le 14 août, 6e souris sacrifiée. Dans le foie macroscopiquement sain, 36 mâles, pigment, très rares oeufs. Dans le mésentère, 38 mâles et 1 femelle isolée.

— le 28 septembre, les 4 souris blanches restantes sont toutes positives (épreuve d'éclosion des déjections).

— le 19 octobre, 7e souris sacrifiée. Foie macroscopiquement normal, contient du pigment, 55 mâles et des oeufs peu nombreux, vivants. Dans le mésentère, 5 mâles et 1 femelle enlacée.

— le 5 novembre, 1 souris morte avec hémorragie intestinale. Début de putréfaction. Dans le foie, oeufs abondants et 60 mâles. Dans le mésentère, 1 mâle. Pas vu de femelles.

— le 8 mars, 1 morte avec hémorragie intestinale. Trouvé 64 mâles et des oeufs. Pas vu de femelles.

— le 11 mars, 1 souris sacrifiée avec foie apparemment normal. Pigment abondant, oeufs peu abondants. Dans le foie, 47 mâles, dans le mésentère, 20 mâles et 1 femelle.

— Les 3 souris grises infestées en juillet sont mortes le 15, 20 et 22 septembre sans hémorragie intestinale. On a trouvé dans le foie de chacune d'elles respectivement 32 femelles et 74 mâles, 5 femelles et 15 mâles, 20 femelles et 70 mâles et des oeufs normaux en abondance. Ces souris sont habituellement aussi sensibles que les blanches. Elles proviennent de l'introduction dans l'élevage de quelques souris noires.

Ainsi, sur 13 souris infestées par les cercaires d'un seul planorbe, en plusieurs séances, une série de 10 donne 9 infestations mixtes, mais où les femelles sont extrêmement rares (1 seulement, la première, aurait peut-être une infection unisexuée). Une deuxième série de 3 autres infestée un mois plus tard

du même planorbe montre des infestations normales, c. a. d. avec un nombre de femelles important atteignant le tiers ou la moitie du nombre des mâles.

Donc, toutes infections bisexuées à partir d'un seul planorbe.

aprés jours	50	50	51	53	53	54	120	135	257	260	52	59	61
mâles	38	50	75	56	72	74	60	61	64	67	74	15	70
femelles	0	1	4	1	?	1	1	?	?	1	32	5	20
oeufs	0	1	+	+	+	+	+	++	++	+	++	++	++

V. — Le 11 décembre 1956, j'isole trois planorbes infestés et 10 souris blanches sont exposées une seule fois aux cercaires issues d'1 seul mollusque infesté. Le 7 février 1957, on examine d'abord en bloc, puis isolément les déjections de ces 10 souris et on en décèle 4 positives à l'épreuve d'éclosion. Les 6 autres examinées à plusieurs reprises ont été régulièrement négatives. Des 4 positives, une première est morte le 23 février: foie gris avec oeufs très nombreux. On y trouve 14 mâles et 12 femelles plus dans le mésentère 2 mâles et 2 femelles. Hémorragie intestinale.

— une seconde est sacrifiée le 11 mars: foie gris avec pigment. Fèces, intestin et foie contiennent des oeufs en abondance; on n'a trouvé aucun adulte, ni mâle ni femelle, malgré un examen très soigneux et très poussé.

— une troisième est sacrifiée le lendemain. Déjections positives, foie gris contenant du pigment et des oeufs en abondance et 1 mâle moribond. Dans le mésentère, 1 femelle vivante et 1 mâle mort.

— une quatrième est sacrifiée le 3 avril. Les déjections sont positives, le foie gris contient des oeufs en abondance qui éclosent à l'épreuve, du pigment et 1 mâle vivant. Dans un amas graisseux du mésentère, je trouve deux femelles et 1 mâle en décomposition, mais encore nettement reconnaissables.

Restent les 6 négatives, après examens répétés des déjections.

— une est morte accidentellement, le 11 février: 2 mâles dans le foie. L'autopsie a été trés imparfaite, la souris étant déjà en voie de putréfaction avancée.

— une seconde est morte le 21 février. Foie gris très pigmenté, ne contenant pas d'oeufs, 40 mâles. Pas d'hémorragie intestinale. L'examen de l'intestin est sommaire, l'animal étant déjà en putréfaction.

— une 3e est sacrifiée le 4 avril. Foie brun et lisse contenant du pigment, pas d'oeufs. On y trouve 11 mâles vivants. Mésentère ne contenant pas de parasites.

— une 4e est sacrifiée le 18 avril. Foie brun, lisse, sans oeufs et contenant très peu de pigment. Ni le foie ni le mésentère ne contiennent de vers adultes.

— une 5e est sacrifiée le 2 mai. Foie brun, luisant, sans oeufs, pigment abondant. On trouve 20 mâles vivants dans le foie et 3 dans le mésentère. Pas de femelles.

— une 6e est sacrifiée le 15 mai. Foie brun, luisant; ni oeufs ni adultes, ni pigment, de même que dans le mésentère. Rate plus grosse que normale, sans oeufs, ni pigment.

aprés jours	73	89	90	112	61	71	113	127	141	154
mâles	16	0	2?	2?	2?	40	11	0	23	0
femelles	14	0	1	2	?	0	0	0	0	0
oeufs	++	++	++	++	—	—	—	—	—	—

VI. — Le 13 février 1957, j'isole 1 planorbe infesté et du 14 au 22 février soit en moyenne le 17, j'expose 1 à 3 souris aux cercaires qui s'échappent d'un même planorbe, soit 10 souris en tout. Du 4 au 30 avril, elles sont soumises à 5 examens collectifs avec recherche de miracidiums qui est régulièrement négative.

— la première est sacrifiée le 30 avril; foie apparemment intact. On y trouve 7 femelles, de rares oeufs abortifs et peu de pigment. Dans le mésentère rien. Une de ces femelles montre un oeuf utérin, ventouses minuscules, extrémité antérieure mince et peu développée de type féminin, mais canal gynécophore dans la moitié postérieure, peau hérissée de papilles. Est-ce à ce spécimen intersexué qu'on peut attribuer les rares oeufs tous de type abortif trouvés dans le foie?

— une 2e est sacrifiée le 2 mai. Foie apparemment intact, très peu de pigment; vu 4 femelles isolées, immatures et minuscules, pas d'oeufs. Rien dans le mésentère. Rate petite. Une des femelles, un peu plus grosse aurait une ébauche de canal gynécophore et la ventouse ventrale un peu plus développée.

— une 3e sacrifiée le 6 mai. Foie apparemment normal, pigment assez abondant, pas d'oeufs. J'isole 10 adultes dont 3 femelles typiques, minces et immatures, 7 vers avec canal gynécophore et papilles épidermiques dans la partie postérieure, extrémité antérieure mince. Ce sont nettement des types intermédiaires, qu'on ne peut guère qualifier d'hermaphrodites et devraient plutôt être considérés comme des asexués, puisqu'aucun des appareils génitaux n'est développé. Rien dans le mésentère. Rate petite.

— Une 4e sacrifiée le 7 mai. Foie luisant, un peu gris. Pigment abondant; vu en tout, 4 oeufs abortifs, 11 vers adutes dont 1 couple, 2 femelles libres normales (?) 7 mâles (?) avec papilles et canal gynécophore, mais sans testicules et avec extrémité céphalique petite. Mésentère, rien.

— une 5e sacrifiée, le 8 mai; foie apparemment normal, pigment rare; après un long examen, je trouve 2oeufs, 1 couple, 3 mâles du type signalé plus haut et 5 femelles immatures. Dans le mésentère, 1 femelle. A total, 11 adultes.

Après ces 5 souris mâles, j'examine les 5 souris restantes, toutes femelles.

— une 1re, sacrifiée le 16 mai; foie luisant, apparemment normal, pigment abondant, pas d'oeufs. Au total, 22 vers adultes vivants dont 3 couples

enlacés, les 9 femelles sont immatures et sans la moindre ébauche d'appareil génital, les 13 mâles (?) ont les 2 tiers postérieurs élargis (canal gynécophore) et couverts de papilles, l'extrémité antérieure lisse et mince, pas trace de testicules. Rien dans le mésentère.

— Une 2e sacrifiée le 20 mai, foie apparemment normal; pigment clair, pas d'oeufs; 9 femelles immatures et minuscules, 3 mâles (?) avec peau converte de papilles, extrémité antérieure mince, sans testicules. Rate petite. Rien dans le mésentère.

— une 3e sacrifiée le 21 mai; foie apparemment normal, pigment noir, pas d'oeufs, 6 femelles immatures et minuscules, 4 mâles (?) du type intersexué. Rate petite; dans le mésentère, une femelle.

— une 4e sacrifiée le 27 et une dernière sacrifiée le 28 mai donnent des résultats pareils à la 3e, avec pigment noir et sans oeufs.

	souris mâles					souris femelles				
après jours	72	74	78	79	80	88	92	93	99	100
mâles (?)	1?	0?	7?	8?	4?	13?	3?	4?	5?	6?
femelles	6	4	3	3	7	9	9	7	11	10
oeufs	+	—	—	+	+	—	—	—	—	1
oeufs fertiles	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Discussion

Le moins qu'on puisse dire de ces expériences est qu'elles donnent des resultats variés et disparates.

I. — 1 souris donne une infection unisexuée après infection par un planorbe, avec hémorragie coecale sans oeufs prouvant que la femelle bien qu'immature se dirige vers l'intestin.

II. — Sur 5 souris exposées à une infestation par un planorbe, toutes ont à moment donné des déjections positives (au moins 2 examens). Mais chez l'une d'elles, les oeufs ont disparu du foie alors que les adultes apparemment normaux sont présents. Chez une autre, les oeufs sont nettement en voie de dégénérescence (pas d'éclosion) et chez la dernière qui porte les traces d'une infection bisexuée avec oeufs vivants, les adultes ont disparu, 10 mois après l'infestation. On ne peut encore parler de guérison, mais les faits suivants montrent qu'il s'agit d'une amorce de guérison qui a été interrompue par l'hémorragie coecale, accident mécanique. Au cours de l'examen de plus de 2000 souris soumises précédemment à des infestations normales, jamais résultat analogue n'a été observé.

III. — Ici, le cas est net. Ces 4 souris sont indemnes après 6 mois. L'une est morte sans signes de bilharziose, donc accidentellement. Les 3 autres, sacrifiées en bonne santé ne présentent aucune trace de bilharziose.

IV. — Cette expérience est plus complexe, mais plus significative. 13 souris ont été soumises aux cercaires d'un même planorbe maintenu isolé pendant plusieurs semaines. Les trois dernières ont fait des infections tout-à-fait normales avec une proportion mâle femelle normale. Il n'en va pas de même dans les autres cas. On peut objecter que chez la première souris, sacrifiée 50 jours après l'infestation, les vers n'étaient pas encore à maturité. Il n'en reste pas moins que chez les 9 autres, les femelles sont très peu nombreuses. Dans 3 cas, elles n'ont pas été trouvées, alors qu'il y avait des oeufs dans le foie. Ont-elles été résorbées ou ont-elles échappé à un examen attentif? Il est impossible d'en décider. Je n'ai plus pu pratiquer actuellement la méthode de YOLLES et coll (2) que j'ai pratiquée autrefois (3) mais il est clair qu'un chercheur exercé ne peut pas rater un nombre important de femelles de *Bilharzia*.

V. — L'expérience V prête à confusion. On a employé 3 planorbes différents. Il est possible que l'un d'eux, toujours le même, ait donné lieu aux 4 infections bisexuées, encore que 2 d'entr'elles se présentent avec un nombre de parasites infime et l'une d'elles sans adultes. Quant aux 6 souris restées négatives, parmi les 3 qui ont été sacrifiées les dernières, 2 ont guéri spontanément, l'une d'elles faisant cependant la preuve de son infestation par le pigment décelé dans le foie.

VI. — Cette dernière expérience a profité des tâtonnements des précédentes. Les 10 souris sont exposées presque simultanément aux cercaires issues d'un même planorbe. Aucune ne donne d'infection normale avec oeufs fécondés de sorte que même dans celles où l'on trouve quelques oeufs abortifs, le type d'infection stérile est respecté.

Abstraction faite de l'expérience V, on a donc pu observer les éventualités suivantes:

A) Infection unisexuée, soit femelle (exp. I) soit mâle typique (expériences antérieures, qui sont les plus fréquentes) et stérile dans les 2 cas.

B) Infection bisexuée, soit normale (une partie de l'exp. 2) soit à issue incertaine (adultes disparaissant après avoir pondu (partie de l'exp. 2) soit sans avoir pondu (?) (exp. 3)).

C) Infection anormale et stérile (exp. 4 *pro parte* et exp. 6) où l'infection du planorbe est soit à prépondérance mâle (exp. 4) soit à prépondérance femelle (exp. 6) comme si le parasite cherchait, sans succès, à produire des adultes des 2 sexes; bien que ceux-ci soient habituellement inféconds, ils ne sont pas dépourvus d'instict sexuel (présence de couples enlacés). Comme on ne trouve jamais de ces anomalies dans les infections par plusieurs planorbes, il faudrait donc admettre que les cercaires ou les schistosomules mâles et femelles s'influencent réciproquement pour arriver à maturité sexuelle!

R. JAFFÉ, M. MAYER et F. PIFANO (4) de Caracas, ont trouvé des infections mixtes à partir d'1 planorbe dans leur travail de 1945. Toutefois, ils observent dans les infections unisexuées des lésions hépatiques qui n'ont pas été retrouvées ici. Ici dans les infections unisexuées, ou produisant des oeufs non fécondés, le foie est pratiquement indemne. S'il était vrai que dans l'infection d'1 planorbe par plusieurs miracidiums, 1 seul d'entre eux arrive à maturité, on concevrait mal l'apparition de parasites anormaux qui a été observée ici. Si par contre, on admet que plusieurs miracidiums mènent leur carrière à bonne fin, on conçoit encore moins la raison d'être des parasites intersexués observés dans l'expérience VI. Aussi avons nous l'intention de reprendre de nouveaux essais parallèles à ceux exposés à ceux qui précèdent avec des planorbes de même souche infectés d'un seul miracidium de la même souche.

Un bonne partie du matériel récolté a été confiée après fixation à Mr. W. ADAM, directeur de laboratoire à l'Institut Royal des sciences naturelles, qui compte en faire une étude détaillée.

RESUME

Des infections bilharziennes de souris provoquées par les cercaires issues d'un seul planorbe (infecté peut être par plusieurs miracidiums) donnent des infections variées: *a*) tantôt unisexuées et stériles; *b*) tantôt bisexuées stériles ou non; *c*) tantôt anormales avec production d'adultes anormaux pseudohermaphrodites d'un type inédit.

RIASSUNTO

L'infestazione bilharziosica del topolino a mezzo di cercarie provenienti da un solo planorbis (presumibilmente infestato da parecchi miracidi) dà luogo a tre tipi di infestazione: *a*) unisessuale e sterile; *b*) bisessuale sterile o no; *c*) anormale con produzione di adulti pseudoermafroditi di tipo finora non descritto.

SUMMARY

Bilharzial infections of mice infected with cercariae originating from a single planorbis (normally infected by several miracidia) produce three types of infections: *a*) unisexual and sterile; *b*) bisexual and sterile or not sterile; *c*) or with abnormal production of pseudohermaphrodites adults of an aspect unseen before.

BIBLIOGRAPHIE

1. LAGRANGE E., PROMEL R. et SCHEECQMANS (1949): *C.R. Soc. Biol. 143.*
2. YOLLES T. K., MOORE D. V., GIUSTI D. L., RIPSOM C. A. et MELENEY H. E. (1947): *J. Parasitology, 33,* 419-426.
3. LAGRANGE E. (1951): *Ann. Bel. Méd. Trop., 31,* 193-206.
4. JAFFÉ R., MAYER M. et PIFANO F. (1945): *Rev. San. y Asist. Soc. 10,* 96 (leur bibliographie a été rassemblée dans un premier travail de 1942 qui ne m'a pas été accessible).
5. LAGRANGE E. (1954): *Riv. di Parass., XV,* 81.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 1 - Gennaio 1958

ULTERIORI OSSERVAZIONI SUI RAPPORTI FRA ORDINAMENTI CROMOSOMICI E RESISTENZA AL DDT IN *ANOPHELES ATROPARVUS* (*)

G. D'ALESSANDRO, G. FRIZZI e M. MARIANI (**)

In una precedente nota (D'Alessandro, Frizzi e Mariani, 1957) sono stati riferiti i risultati di indagini miranti a dimostrare una eventuale relazione fra resistenza al DDT ed ordinamenti cromosomici in *Anopheles atroparvus* (***). In effetti:

1) la popolazione del ceppo di *A. atroparvus* allevato in questo laboratorio per ricerche sulla resistenza e mai sottoposto a selezione di fronte agli insetticidi, risultò eterogenea rispetto alla sensibilità al DDT;

2) gli individui dello stesso ceppo, esaminati con le tecniche citogenetiche secondo Frizzi (1953), risultarono differenziabili in quanto dotati di tre diversi ordinamenti cromosomici, riferibili al braccio sinistro del terzo cromosoma e cioè: ordinamento standard, ordinamento invertito, interessante un segmento che va dalla zona 41 al limite della zona 47-48, ed ordinamento eterozigote;

3) indagini dirette ad accertare un possibile rapporto fra i predetti ordinamenti cromosomici e sensibilità al DDT misero in evidenza che in larve appartenenti a ceppi selezionati di fronte al DDT ed ormai in possesso di modesto grado di resistenza esisteva una maggiore frequenza dell'ordinamento invertito, sia allo stato omozigote che allo stato eterozigote, nei confronti del ceppo originario non trattato. Analogamente, in larve sottoposte a trattamen-

---

(*) *Ricerche eseguite sotto gli auspici e con il contributo dell'Alto Commissariato per l'Igiene e la Sanità.*

(**) *Istituto d'Igiene dell'Università di Palermo.* (Direttore: Prof. G. D'Alessandro).

(***) I dati delle indagini menzionate sono stati resi noti anche attraverso la *Information Circular on the Resistance Problem*, n. 2. pubblicata dalla « Organisation Mondiale de la Santé » nel settembre 1956.

to insetticida, predominarono tra le superstiti quelle aventi ordinamenti cromosomici invertito ed eterozigote, mentre nelle soccombenti predominò l'ordinamento standard. Si poteva ritenere, pertanto, verosimile l'esistenza di un rapporto tra tipo di ordinamento cromosomico e resistenza al DDT.

Più recentemente MARIANI e BRUNO (1957) hanno descritto cromosomi politenici nei trofociti ovarici e nei nuclei delle cellule dei tubi malpighiani, il che ha reso possibile lo studio di ordinamenti cromosomici anche in adulti di Anofeli.

Vanno inoltre menzionati gli studi di FRIZZI e HOLSTEIN (1957) sugli ordinamenti cromosomici in ceppi di laboratorio di *A. gambiae* e le ricerche di HOLSTEIN (1957) il quale rese noto come in ceppi sensibili di *A. gambiae* erano presenti soltanto ordinamenti standard, mentre in un ceppo resistente al Dieldrin ed al Lindane erano frequenti le inversioni, sia allo stato omozigote che allo stato eterozigote.

Attraverso l'ulteriore proseguimento delle nostre indagini, sui procedimenti selettivi idonei a realizzare il costituirsi di popolazioni resistenti all'insetticida, abbiamo ottenuto un ceppo denominato IV. Il metodo di selezione di tale ceppo consistette nel trattamento allo stadio larvale con dosi piccole, continue e crescenti di generazione in generazione, di DDT, ed allo stadio di adulto mediante esposizione, anche in questo caso di ciascuna generazione, a superfici trattate con l'insetticida.

Alla 12ª generazione gli adulti di questo ceppo presentavano una resistenza al DDT cinque volte superiore a quella del ceppo di origine, mentre le larve dimostrarono di sopportare, durante tutta la loro vita, una concentrazione di DDT dieci volte superiore a quella sopportata da larve del ceppo originario (D'ALESSANDRO e MARIANI, 1957).

Parve, pertanto, opportuno procedere ad un nuovo esame del problema sopra delineato sul rapporto tra ordinamenti cromosomici e resistenza al DDT.

In questa nota diamo, pertanto, i risultati del confronto tra gli ordinamenti cromosomici del ceppo di origine, non sottoposto a trattamenti insetticidi, e quelli del ceppo IV, sopra descritto.

L'esame comparativo venne seguito sulle generazioni 11ª e 12ª del ceppo IV e sulle coeve due generazioni del ceppo di origine.

Le tecniche di dissezione, colorazione e lettura dei cromosomi sono quelle descritte da FRIZZI (1953), per le larve, e da MARIANI e BRUNO (1957) per gli adulti.

I calcoli statistici sono stati eseguiti applicando il saggio del χ^2 secondo Snedecor (1956).

* * *

Sono stati esaminati complessivamente 895 individui di *Anopheles atroparvus* e precisamente: 240 dell'11ª generazione del ceppo IV, 175 della 12ª generazione dello stesso ceppo, in confronto a 240 e 140 individui, rispettivamente,

di generazioni coeve del ceppo di origine allevato in assenza di trattamenti selettivi.

La distribuzione degli ordinamenti cromosomici riscontrati, è espressa percentualmente nella Tabella I.

TABELLA I.

Ordinamenti cromosomici osservati in due generazioni di un ceppo selezionato di fronte al DDT e due generazioni coeve del ceppo non trattato. (a - generazione coeva alla 11ª del ceppo IV; a' - generazione coeva alla 12ª del ceppo IV)

Ordinamenti cromosomici	Ceppo IV				Ceppo d'origine			
	11ª generazione		12ª generazione		a		a'	
	n° ind.	%	n° ind.	%	n° ind.	%	n° ind.	%
Standard	52	21,66	38	21,71	190	79,1	113	80,73
Eterozigote	162	67,5	131	74,8	50	20,9	27	19,27
Omozigote invertito . .	26	10,84	6	3,49	0	—	0	—
Totali . . .	240		175		240		140	

Nella tabella II sono confrontati gli ordinamenti osservati e quelli aspettati nella 12ª generazione del ceppo IV e nella coeva del ceppo non trattato, in base alla legge di Hardy Weimberg.

TABELLA II.

Confronto fra le percentuali di ordinamenti cromosomici osservati e percentuali aspettate nella 12ª generazione del ceppo IV e nella coeva generazione del ceppo d'origine.

	Ceppo IV, 12ª generazione			Ceppo d'origine, gen. coeva della 12ª del ceppo IV		
	standard	eterozigoti	omozigoti invertiti	standard	eterozigoti	omozigoti invertiti
Frequenza . . .	0,554	—	0,445	0,903	—	0,096
Percentuali osservate.	21,71	74,8	3,49	80,73	19,27	0
Percentuali aspettate .	30,7	49,4	19,8	80,20	18,7	1,9
Differenze . . .	— 8,99	+ 25,4	— 16,31	+ 0,53	+ 0,57	— 1,9

Dall'esame della tabella II risulta evidente che, mentre gli ordinamenti aspettati e quelli osservati nel ceppo di origine si discostano di valori trascurabili, nel ceppo IV gli stessi dati differiscono largamente. Infatti l'analisi statistica dei dati di confronto relativi al ceppo IV dà un $\chi^2 = 53{,}28$ indicante, con due gradi di libertà, una probabilità estremamente bassa che le differenze siano puramente casuali.

La frequenza della inversione eterozigote nel ceppo IV, la sua ampiezza che interessa circa due terzi del braccio sinistro del terzo cromosoma, nonchè la sua struttura caratteristica (fig. 3), hanno permesso l'analisi di due diversi tipi speculari di unioni sinaptiche che indichiamo, rispettivamente, con A e B. Su 261 inversioni eterozigoti esaminate nel ceppo IV, 149 appartenevano al tipo A e 112 al tipo B.

Questa è la prima volta che in ricerche citogenetiche sono studiate le frequenze dei due possibili tipi di sinapsi in una inversione eterozigote. Ora, tali tipi di sinapsi, anche attraverso il vaglio della analisi statistica, sembrano possedere valori adattativi diversi.

TABELLA III.

Analisi statistica dei due tipi di unioni sinaptiche negli eterozigoti.

	Tipo A	Tipo B	Totale
N° individui per tipo.	149	112	261
$\frac{A + B}{2}$	130,5	130,5	261
$\frac{A - B}{2}$	18,5	18,5	37
	$\chi^2 = \frac{2\ (18{,}5)^2}{130{,}5} = 5{,}245$		

A questo riguardo non possiamo, però, esprimere un giudizio definitivo e ci riserviamo di approfondire questo aspetto del problema attraverso lo studio di un maggior numero di individui eterozigoti del ceppo di origine e del ceppo selezionato.

Al fine di stabilire se le differenze di sensibilità per i due ceppi ora esaminati fossero dovute anche a riordinamenti strutturali minuti di altri segmenti del corredo cromosomico, abbiamo incrociato femmine del ceppo IV con maschi di un ceppo omozigote standard isolato recentemente dal ceppo di origine (D'ALESSANDRO e MARIANI, 1957). L'esame della F_1 di tale incrocio ha mostrato

la completa sinapsi dei cromosomi omologhi, permettendoci di escludere qualsiasi altro tipo di riordinamento cromosomico o differenze geniche così profonde da essere rilevate attraverso segmenti cromosomici asinaptici. C'è però da osservare che, a somiglianza del ceppo d'origine, anche il ceppo standard non è omogeneamente sensibile al DDT ed infatti da quest'ultimo ceppo è in corso la selezione di un ceppo DDT resistente (D'ALESSANDRO e MARIANI, l. c.).

* * *

Le deduzioni che si possono trarre dalle osservazioni sopra riferite, contribuiscono a chiarire alcuni aspetti del problema della resistenza.

La frequenza dei tre riordinamenti cromosomici nei due ceppi è così nettamente diversa da rendere superflua una elaborazione statistica dei dati. Essa mostra che l'ordinamento eterozigote è largamente favorito nella selezione di fronte all'insetticida; ed anche il confronto fra due generazioni successive (11ª e 12ª) del ceppo trattato, mostra il progressivo selezionarsi degli eterozigoti sotto l'influenza del DDT. Nel ceppo d'origine, infatti, lo scostamento delle frequenze nelle due generazioni è puramente casuale, mentre non lo è, con chiara evidenza, quello fra le due generazioni dl ceppo IV. Vale a dire che la popolazione della 12ª generazione non soltanto mantiene l'alta frequenza dell'ordinamento eterozigote, ma tende ad ulteriormente aumentarla.

I due riordinamenti omozigoti hanno, dunque, un valore adattativo inferiore a quello posseduto dal riordinamento eterozigote di fronte all'insetticida. Il proseguimento delle osservazioni sulle successive generazioni potrà mostrarci fino a qual punto una ulteriore azione selettiva opererà nella direzione attualmente rilevata.

Come già abbiamo accennato nella nostra precedente nota sull'argomento, sembra potersi affermare che, a causa della mancanza di interscambio, i fattori localizzati nel segmento invertibile vengono trasmessi totalmente, in blocco, alla prole. E' su tale possibilità di conservare, attraverso l'inibizione dell'interscambio, un blocco genetico propizio alle nuove condizioni di vita, imposte dal contatto con l'insetticida, che si fonda verosimilmente la selezione preferenziale dell'ordinamento eterozigote.

RIASSUNTO

In questa seconda nota sui rapporti fra ordinamenti cromosomici e resistenza al DDT dell'*Anopheles atroparvus* viene ulteriormente messa in luce, attraverso una ricerca confortata dall'analisi statistica dei dati, l'azione selettiva del DDT sugli ordinamenti cromosomici.

L'ordinamento eterozigote risulta largamente favorito. E' verosimile che i fattori localizzati nel segmento del quale si osserva l'inversione vengano trasmessi in blocco alla prole per mancanza di interscambio.

SUMMARY

In the present paper, wich is the second one on the connection between chromosomic arrangements and resistance to DDT in *Anopheles atroparvus* the selective action of DDT on the chromosomic arrangements is further illustrated by means of an investigation in wich the data are confirmed by a statistical analysis.

The heterozygous arrangement appears to be widely favoured. It is probable that the factors localized in the segment whose inversion is observed, are transmitted as a whole to the offspring owing to a lack of crossing-over.

BIBLIOGRAFIA

D'Alessandro G., Frizzi G. e Mariani M. (1957): *Bull. Org. Mond. Santé*, *16*, 859-864

D'Alessandro G. e Mariani M. (1957): (*in corso di stampa*).

Frizzi G. (1953): *Bull. Org. Mond. Santé*, *9*, 335.

Frizzi G. e Holstein M. (1956): *Bull. Org. Mond. Santé*, *15*, 425-435.

Holstein M. (1957): *Bull. Org. Mond. Santé*, *16*, 456-458.

Mariani M. e Bruno Smiraglia C. (1957): *Boll. Soc. Ent. Ital.*, *87*, 23-25.

O. M. S. (1956): Information circular on the resistance problem no. 2, Settembre.

Snedecor G. W. (1946): Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. 4th ed., Ames, Iowa.

I tre ordinamenti che si osservano nel braccio sinistro del 3° cromosoma di Anopheles atroparvus:

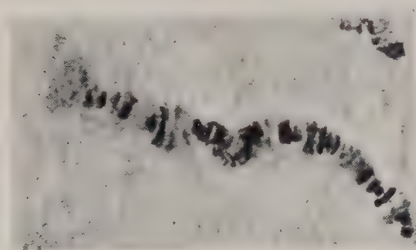


Fig. 1. - Ordinamento standard.

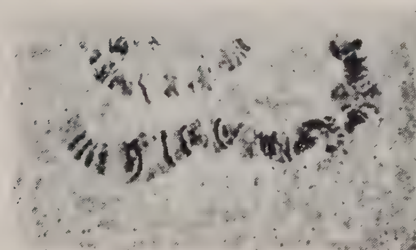


Fig. 2. - Ordinamento omozigote invertito.

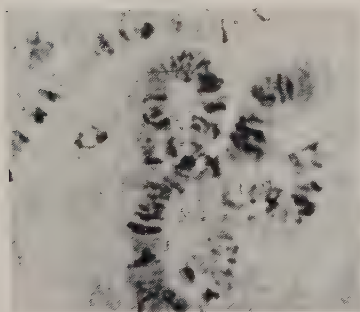


Fig. 3. - Ordinamento eterozigote (Tipo A.).

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 1 - Gennaio 1958

NOTE E OSSERVAZIONI

OSSERVAZIONI SUL GRADO DI SENSIBILITA' DI *MUSCA DOMESTICA* L. VERSO IL MALATHION NELLA ZONA DI CHIANCIANO DOPO QUATTRO ANNI DI TRATTAMENTO

Vari autori hanno segnalato recentemente l'insorgenza di una resistenza in popolazioni di *Musca domestica* verso il malathion e il diazinone in seguito al loro impiego prolungato in laboratorio o in ambienti naturali.

In laboratorio, MARCH, LEWALLEN e METCALF (7), nel 1956, ottenevano dopo 16 generazioni selezionate con malathion, una resistenza 12 volte superiore ai valori iniziali e MELTZER (11), nello stesso anno, selezionava un ceppo verso il diazinone ottenendo in 13 generazioni una resistenza 20 volte superiore ai valori iniziali.

KEIDING (4), nel 1956, segnalava l'insorgenza della resistenza verso il diazinone dopo che questo prodotto era stato usato in Danimarca su vasta scala alla dose di circa 0,2g/m². SACCÀ (13) in provincia di Latina, nel 1957, osservava una resistenza verso il diazinone nelle popolazioni di mosche di tutta la provincia dopo 4 anni di lotta con questa sostanza alla dose di 0,2g/m². L'Autore riferiva inoltre che il primo insorgere della resistenza si era manifestato in una località prossima allo scarico di immondizie della città di Latina, anch'esso trattato con diazinone. WIESMANN (15) in Svizzera, nel 1957, notava l'insorgere di una resistenza al diazinone dopo 4 anni che tale prodotto era stato impiegato nel campo pratico su vasta scala. LABRECQUE e WILSON (6) nel 1957, segnalavano l'insorgenza di resistenza al malathion in centri di pollicoltura in Florida, dopo 2 anni e mezzo di trattamento antilarvale ed antialate (per contatto e per mezzo di esche avvelenate) con lo stesso prodotto. KILPATRICK e SCHOOF in Georgia (U.SA.), nel 1957, osservavano l'insorgenza di resistenza (fisiologica e di comportamento) verso il malathion da parte di popolazioni di mosche domestiche provenienti da un centro agricolo (su tre trattati), isolato, che era stato trattato per 2 anni con malathion alla dose di 2g/m² ed ove, nel 1956, si erano usate per 12 settimane esche avvelenate a base di malathion. Questo ceppo di mosche resistenti al malathion fu poi studiato in laboratorio da FAY, KILPATRICK e MORRIS (3) sempre nel 1957, parallelamente ad un altro ceppo, anch'esso resistente al malathion, proveniente dall'Arizona (*).

Durante gli anni 1953-57, a Chianciano (Siena), è stata condotta una campa-

---

(*) Ringrazio il Dott. R. W. FAY per avermi cortesemente inviato i riassunti dei lavori (3, 5) prima della loro pubblicazione.

gna (*) contro la mosca domestica con l'impiego di malathion, campagna che, contrariamente a molti casi segnalati nella letteratura, non ha portato dopo 5 anni all'insorgenza di una resistenza alla suddetta sostanza. Ritengo pertanto opportuno, avendo personalmente seguito periodicamene la lotta, riportare brevemente alcune osservazioni sulle condizioni in cui essa è stata effettuata e sull'attuale sensibilità, verso l'insetticida usato, di popolazioni di mosche provenienti dall'area trattata e da quella limitrofa non trattata

La zona trattata comprende circa 120 poderi costituenti un anello intorno alla zona termale alberghiera di Chianciano (Fig. 1). In tutta la zona di Chianciano, come ci è stato riferito sul posto, durante gli anni 1948-50 fu usato DDT e, nel solo 1950, lindano; già dopo il primo anno di trattamento, fu notato una resistenza da parte di *M. domestica* verso il DDT, ed in seguito verso gli altri insetticidi clorurati, tale da determinare, nel 1950, l'abbandono di questi prodotti.

Nel 1953 si iniziò ad impiegare il malathion, secondo i criteri seguenti. I trattamenti furono estesi agli interni delle stalle, porcili, cucine e parzialmente all'esterno dei muri delle suddette stalle e porcili, della concimaia (evitando di irrorare il letame), ecc. Le irrorazioni (6-7 per stagione) furono effettuate ogni 20-25 giorni, dal 15 maggio al 15 ottobre circa. Fu impiegata una emulsione di Malatox (50% di malathion) all'1% durante i primi 2-3 trattamenti ed al 2% durante i seguenti, con l'aggiunta di melassa (1% durante il 1953, 3% durante il 1954 e 5% durante i seguenti anni).

Con i mezzi impiegati per l'irrorazione nelle stalle (motopompa) (10), la concentrazione del malathion sulle pareti è stata superiore a 0,20g/m² (emulsione all'1%) ed a 0,40g/m² (emulsione al 2%), mentre con le pompe a spalla impiegate per l'irrorazione delle pareti delle cucine, è stata pari a circa 0,20g/m² (emulsione 1%) ed a 0,40g/m² (emulsione 2%).

Nella zona termale-alberghiera, negli anni 1953-56 la lotta contro le mosche fu pressoché nulla, mentre nel 1957 le cucine (ed annessi) degli alberghi furono periodicamente trattati con lo stesso metodo usato nell'area periferica. In Chianciano città, che è compresa nella zona sotto trattamento, sono stati irrorati solo l'ospedale, le stalle, le zone di scarico rifiuti. Il controllo della densità delle mosche fu eseguito periodicamente mediante carta moschicida in 5 cucine di case coloniche della zona trattata ed in 5 della zona circostante non trattata. (**) I confini della zona trattata ed i metodi di lotta sono stati pressochè costanti durante gli anni 1953-57

Le campagne degli anni 1953-56 avevano sempre portato buoni risultati (8, 10). A fine campagna 1956, cioè dopo 4 anni di lotta con malathion, si volle indagare sul grado di sensibilità verso questo prodotto da parte delle popolazioni di *M. domestica* presenti nella zona trattata, al fine di poter indirizzare i tecnici responsabili della lotta verso le sostanze da impiegare negli ulteriori trattamenti.

Prove preliminari di confronto eseguite nel novembre 1956 sulla F_1 di materiale raccolto nella zona trattata ed in quella limitrofa non trattata non avevano mostrato differenze significative nella sensibilità verso il malathion. In data 7/5/1957 fu, poi, catturato nuovo materiale in 4 case coloniche, scelte a caso, nella zona trattata ed in 3 case coloniche distanti 1-2 chilometri dal perimetro esterno della zona trattata. Il materiale (100 esemplari di ambo i sessi della prima zona e 150 della seconda) è stato allevato in laboratorio secondo gli usuali metodi. Prove di abbattimento ese-

---

(*) Campagna effettuata dalla S. I. A. P. A. per conto dell'azienda di Cura di Chianciano Terme

(**) Per maggiori dettagli sulla topografia della zona trattata e sui metodi di irrorazione e controllo durante gli anni 1953-55, vedi MELIS R. e CATELLA F. (10)

guite sulla F_1 secondo la tecnica di KOCHER (16) modificata da ASCHER (*), non hanno mostrato differenze significative fra le popolazioni di mosche, come riportato nella tabella I. Non avendo ottenuto dalla F_1 materiale sufficientemente abbondante, l'allevamento è stato continuato. Prove di contatto, su carta da filtro trattata con



Fig. 1. — —.—.—.— Perimetro esterno della zona trattata.
——— Perimetro esterno della zona protetta.

malathion in acetone, hanno dato le seguenti LC_{50} sulla F_1 : per la zona non trattata (prove eseguite su gruppi di 25 femmine) la LC_{50} è risultata pari a 0,56 g/m²: per la zona trattata a 0,32 g/m². Non si sono potuti usare gruppi di mosche più numerosi a causa del basso numero di uova deposte dalla F_1.

In seguito a queste prove fu deciso di continuare anche per il 1957, nella zona di Chianciano, lo stesso tipo di lotta effettuato negli anni precedenti .I risultati, derivati dagli indici di cattura, ottenuti durante la campagna del 1957 sono stati analoghi a quelli ottenuti negli anni precedenti (8, 9, 10). E' presumibile quindi che non

(*) Comunicazione personale.

sia stata indotta nella popolazione di mosche della zona trattata una resistenza anche di poche volte superiore ai valori originari, altrimenti questo avrebbe potuto condurre non solo a risultati pratici inferiori agli anni precedenti, ma, per analogia a quanto riportato da KEIDING per il diazinone (4) e da KILPATRICK e SCHOOF per il malathion (5), anche ad un completo fallimento della campagna.

La differenza sostanziale fra i risultati conseguiti a Chianciano e quelli riferiti da altri autori (5, 6) nella lotta contro la mosca domestica, porta a formulare alcune considerazioni sui probabili fattori che l'hanno determinata.

A prescindere dalla differenza genetica fra popolazioni di una stessa specie, fatto

TABELLA I.

Numero di individui abbattuti (femmine di M. domestica, F_1) ad intervalli di tempo in seguito a contatto continuo con superfici di vetro (capsule di Petri) trattate con malathion in acetone a varie concentrazioni. Ogni capsula contiene 10 individui; 4 repliche per concentrazione.

Zona trattata

Malathion g/m²	1				0,1				0,01				0,001			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
10′	9	8	9	3	0	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
20′	10	10	10	8	6	8	7	4	1	0	0	0	0	0	0	0
30′	10	10	10	10	10	10	10	9	6	0	0	0	0	0	0	0
60′	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0
90′	10	10	10	10	10	10	10	10	10	2	1	5	0	0	0	0
120′	10	10	10	10	10	10	10	10	10	2	2	6	0	0	0	0
	59	58	59	51	46	51	49	44	37	4	3	11	0	0	0	0

Zona non trattata

Malathion g/m²	1				0,1				0,01				0,001			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
10′	8	10	8	3	3	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20′	10	10	10	10	10	8	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0
30′	10	10	10	10	10	10	10	8	0	0	0	0	0	0	0	0
60′	10	10	10	10	10	10	10	10	1	0	0	0	0	0	0	0
90′	10	10	10	10	10	10	10	10	3	0	4	1	0	0	0	0
120′	10	10	10	10	10	10	10	10	3	1	5	3	0	0	0	0
	58	60	58	50	53	50	55	40	7	1	9	4	0	0	0	0

che può già di per sè indicare una diversa attitudine a dare popolazioni resistenti (12), vanno segnalate alcune condizioni particolari di questa campagna, che qui elenchiamo: *a*) l'estensione relativamente piccola dell'area trattata, che ne riduce a circa un chilometro la profondità massima; *b*) la limitazione, intenzionale, della lotta allo stadio adulto dell'insetto; *c*) l'eliminazione dei centri di intensa produzione di mosche (quale l'immondezzaio della città di Chianciano (*)).

Per quanto riguarda il primo punto, le caratteristiche topografiche della zona trattata potrebbero aver permesso, nel nostro caso, un facile scambio fra individui delle zone limitrofe non trattate ed individui della zona sotto trattamento. (Le distanze massime, 1-1,5 Km., rientrano ampiamente, come è noto, nelle distanze di dispersione della specie).

La limitazione della lotta allo stadio adulto della specie fu da tempo consigliata, per ovvie ragioni, come condizione necessaria al rallentamento del processo selettivo (1, 2, 14). (Se anche un trattamento antilarvale deve essere fatto, è utile effettuarlo con una sostanza che abbia diverso meccanismo d'azione (1)). Nella zona di Chianciano, onde evitare un massivo trattamento larvale, furono impartite norme precise affinchè non venissero trattate le concimaie dei centri rurali.

Per quanto riguarda l'eliminazione di focolai di intensa produzione di mosche (vedi eliminazione dell'immondezzaio principale della città di Chianciano), è ovvio che così operando si viene a diminuire la produzione totale di individui nell'area sotto trattamento. Di conseguenza, la selezione verso la sostanza insetticida viene ad effettuarsi su di un numero più basso di individui, creando condizioni sfavorevoli per il processo i selezione stesso.

Evidentemene, con i dati di cui attualmente si dispone non è possibile stabilire a quali fattori sia principalmente dovuta la mancata insorgenza di una resistenza verso il malathion nella zona presa in esame.

(*) Lo scarico d'immondizie, che in origine distava 150 m dal limite della città di Chianciano e che fu trattato con Miafonina Berlese fino al 1950 e poi con DDT negli anni 1950-52, fu spostato nel 1953 a circa un chilometro al di fuori del perimetro esterno della zona trattata, da dove i rifiuti venivano distribuiti ogni giorno ai contadini che li allontanavano ulteriormente per usarli come concime per i campi.

BIBLIOGRAFIA

1) Bruce W. N. e Decker G. C. (1952): *Soap San. Chem. 26* (3), 122.

2) Decker G. C. e Bruce W. N. (1952): *Am. J. Trop. Med. Hyg. 1*, 395.

3) Fay R. W., Kilpatrick J. W. e Morris G. C. (1958): (In corso di stampa) *J. Eco. Ento.*

4) Keiding J. (1956): *Science 123*, 1173.

5) Kilpatrick J. W. e Schoof H. F. (1958): (In corso di stampa) *J. Eco. Ento.*

6) Labrecque G. C. e Wilson H. G. (1957): *Agr. Chem. 12*, 46.

7) March R. B., Lewallen L. L. e Metcalf R. L. (1956): *W.H.O. Insecticides/59. Mimeographed*, 17 pp.

8) Melis R. (1957): *Ig. San. Pubbl. 13* (9-10), 1.

9) Melis R. (1957): (Comunicazioni personali).

10) Melis R. e Catella F. (1956): *Riv. It. Igiene 16* (3-4), 1.

11) MELTZER J. (1956): *Mededelingen Landbouw. Opzoekingsst. Staat Gent. Jaarg. 21*, 459.

12) MILANI R. (1957): Genetica ed Entomologia, Vol. II, Tip. del Libro, Pavia.

13) SACCÀ G. (1957): *Riv. Parass. 18*, 289.

14) SIMMONS S. W. (1954): I Simposium Intern. per la lotta contro gli insetti vettori di malattie trasmissibili. *Suppl. Rend. Ist. Sup. San.* p. 97.

15) WIESMANN R. (1957): (Comunicazioni personali al W.H.O., 4 giugno 1957) *W.H.O. Inf. Circ. on the Res. Problem, No. 8, Sept.*

16) WIESMANN R. e KOCHER C. (1951): *Ztschrft. angw. Entomol. 33*, 297.

BETTINI SERGIO
*(Istituto Superiore di Sanità,
Laboratorio di parassitologia, Roma)*

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 1 - Gennaio 1958

RECENSIONI

FAUST E. C. & RUSSEL P. F. - Craig and Faust's *Clinical Parasitology*, 6ª ed.. 1078 pp., 346 figg., 7 tavv. a colori. Lea & Febiger, Philadelphia 1957, doll. 15.00

Il continuo felice sviluppo degli studi parassitologici che, di pari passo con il sempre maggiore riconoscimento della importanza rivestita dai parassiti nel campo della salute umana, si è venuto verificando nel corso degli ultimi anni ha portato alla acquisizione di molte e spesso determinanti conoscenze sia nei riguardi della biologia, intesa nel senso più lato, dei parassiti, che in quelli delle malattie che determinano e della terapia e della lotta contro di esse. Tali nuove acquisizioni non potevano non essere inserite, trattandosi di una nuova edizione, in un classico della parassitologia medica quale il *Clinical Parasitology* di CRAIG e FAUST; ma poichè l'inserimento non poteva essere effettuato *tout court*, e ciò anche in considerazione della necessità di non aumentare eccessivamente la già cospicua mole del volume, gli AA. della presente edizione — lo stesso FAUST affiancato dal RUSSEL e con l'assistenza di D. R. LINCICOME — si sono sobbarcati alla fatica non lieve di una completa revisione dell'opera, e con un lavoro spinto anche in profondità come facilmente emerge da una accurata comparazione con l'edizione precedente. Non soltanto infatti sono state inserite parti del tutto nuove, e certi capitoli riscritti di sana pianta — attingendo largamente in ambo i casi alla recente opera del solo FAUST « *Animal agents and vectors of human disease* » (v. questa Rivista, XVII, 1956, p. 62), da cui sono state anche riprese numerose delle nuove figure — ma quasi ogni periodo del libro è stato rimaneggiato: ogni concetto espresso è stato accuratamente vagliato, semplificato nella sua enunciazione, più correttamente precisato quando necessario; molti particolari non essenziali sono stati eliminati: la trattazione della morfologia delle singole specie è stata per esempio in molti casi sensibilmente ridotta, limitandola alla citazione di quei soli caratteri effettivamente determinanti ai fini del riconoscimento. Il risultato è stato quello di migliorare ancora la già ottima opera aumentandone la funzionalità ad indiscusso vantaggio del lettore che ha così a disposizione un testo dalla informazione sicura, aggiornata, di facile ricerca; si aggiunga che molto opportunamente in questa nuova edizione le indicazioni bibliografiche sono state sistemate, eventualmente divise per argomenti, in calce a ciascun capitolo.

Per quanto si è detto finora è evidente che è praticamente impossibile indicare tutte le modifiche apportate in questa nuova edizione. Ci si limiterà quindi a ricordare soltanto come nuove o quasi risultino, tra le principali, le parti riguardanti i parassiti ed il loro ambiente, i metodi epidemiologici, l'infezione da *Pneumocystis*, la *larva migrans* viscerale, l'echinococcosi alveolare da *E. multilocularis*, per la quale viene accettata la separazione specifica da *E. granulosus*, la resistenza agli insetticidi, l'appendice tecnica, ecc. ecc.; nuove sono ancora la maggior parte delle carte sulla distribuzione geografica delle varie parassitosi, una tavola a colori e cioè quella degli stadi preeritrocitici di *P. ovale*, la chiave delle famiglie e generi delle zecche, quella degli anofeli degli Stati Uniti, ecc. Numerose sono anche le modifiche al corpo grafica, in dipendenza del cam-

biamento di importanza talora verificatosi per gli argomenti trattati. Aggiungeremo ancora che nella trattazione delle singole specie i dati storici e geografici sono ora quasi sempre esposti in unico paragrafo, come anche in un solo paragrafo sono accomunati patogenesi, patologia e sintomatologia; è stato anche spostato il paragrafo della prognosi che non precede più ma segue quello della terapia. Va finalmente segnalata la cura particolare dedicata all'iconografia: alcune foto poco chiare della precedente edizione sono state abolite ;parecchie ottime figure, specialmente disegni, sono stati aggiunti. Lodevole, come d'uso, l'edizione.

M. Ricci

Metcalf R. L. (Editore) - *Advances in Pest Control Research.* - Vol. I. Interscience Publ., Inc., New York, 1957. Prezzo doll. 11,00.

I rapidi progressi compiuti in questi ultimi anni dai ricercatori nel campo dei « pesticidi » (intendendo con tale termine tutte le sostanze ad azione insetticida, fungicida, erbicida e ratticida) hanno reso necessaria la lodevole iniziativa di Metcalf di raggruppare in un unico volume, il primo di una serie, monografie di aggiornamento sui vari argomenti in questo vasto campo. Nell'opera sono compresi i seguenti capitoli. « Controllo dei rischi associati all'uso dei "pesticidi" » di J. M. Barnes. « La chimica ed il meccanismo d'azione degli erbicidi » di A. S. Crafts. « L'uso dei radioisotopi nella ricerca sui "pesticidi" » di P. A. Dahm. « La chimica ed azione degli insetticidi del gruppo degli esteri fosforici » di T. R. Fukuto. « I meccanismi d'azione tossica nei miceti » di J. G. Horsfall. « Recenti progressi nella lotta contro i miceti del suolo » di J. B. Kendrick, Jr., e G. A. Zentmyer. « I repellenti per gli artropodi ematofagi » di G. F. Shambaugh, R. F. Brown e J. J. Pratt, Jr. « Lo stato attuale degli insetticidi sistematici in rapporto ai metodi di lotta » di W. E. Ripper. « Analisi chimiche sui residui dei "pesticidi" » di M. S. Schechter e I. Horstein. « Prove biologiche sui residui dei "pesticidi" » di Yun-Pei Sun.

La notorietà stessa degli autori dei singoli capitoli garantisce l'interesse immediato che il volume deve suscitare negli ambienti sia di pura ricerca nel campo degli insetticidi, fungicidi ed erbicidi, che di applicazione pratica. Affascinante per l'uomo di scienza in genere, inoltre, sarà la conoscenza dei progressi compiuti in questi ultimi anni su argomenti relativi agli insetticidi sistemici, agli erbicidi, ecc. Ed a questo si unirà il vero piacere che deriva dalla lettura amena di alcuni capitoli, quale quello sul meccanismo d'azione delle sostanze tossiche verso i miceti, redatto da J. G. Horsfall. Non possiamo che augurarci che questo primo volume venga presto seguito da altri e che la scelta degli autori dei singoli capitoli sia sempre così accurata.

S. Bettini

Direttore responsabile: Dott. E. Mosna

Soc. An. Poligrafica Italiana — Roma. Via della Guardiola, 22

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 2 Aprile 1958

STUDI SU *ENTAMOEBA MOSHKOVSKII*
I. VELOCITA' D'AZIONE DI 16 FARMACI SUI TROFOZOITI DI *ENTAMOEBA MOSHKOVSKII* TSHALAIA, 1941, A 3 DIVERSE TEMPERATURE

IVO DE CARNERI (*)

Entamoeba moshkovskii Tshalaia, 1941, protozoo a vita libera, è stato isolato dai fanghi di sedimentazione di acque di scarico a Mosca, Minsk, Leningrado (TSHALAIA, 1941, 1947; GNEZDILOV, 1947), a San Paolo del Brasile (AMARAL e AZZI-LEAL, 1949) e a Londra (NEAL, 1950). La sua morfologia è assai simile a quella di altre entamebe a cisti tetranucleate ed il suo processo di excistazione, caratterizzato dalla formazione finale di otto amebule mononucleate, lo avvicina al gruppo costituito da *E. aulastomi*, *E. ranarum*, *E. invadens* ed *E. histolytica* (NEAL, 1953).

Esso differisce da *E. histolytica* per la capacità dei suoi trofozoiti di sopravvivere, oltre che alla temperatura di 37°C, anche a temperature più basse. NEAL (1953) ha constatato che i trofozoiti si possono conservare fino a due mesi a +4°C; i trofozoiti del ceppo mantenuto nel nostro laboratorio si conservano attivamente mobili in diversi terreni di cultura dopo 5 mesi a +4°C.

Nonostante queste differenze fisiologiche, *E. moshkovskii* è stato preso in considerazione come possibile fase a vita libera di *E. histolytica* (vedi DE CARNERI, 1958 a).

Da una parte la sua somiglianza con *E. histolytica* ed *E. invadens*, dall'altra il vasto margine di temperatura entro cui i suoi trofozoiti si mantengono vitali, fanno di *E. moshkovskii* un interessante modello per lo studio della velocità d'azione dei farmaci antiamebici.

In precedenti lavori ho messo in evidenza notevoli differenze tra le velo-

---

(*) *Istituto d'Igiene e Microbiologia, Università di Pavia* e *Istituto Carlo Erba per Ricerche Terapeutiche, Laboratorio di Microbiologia, Milano* (Direttore: Prof. L. CHECCACCI).

cità d'azione di sostanze come l'emetina e la fumagillina (DE CARNERI, 1957, 1958 d) e di nuovi antiamebici contenenti il raggruppamento dicloroacetamidico (DE CARNERI, 1958 b) su *E. invadens* coltivata alla temperatura ottimale di 26°C e su *E. histolytica* coltivata a 37°C. Un simile studio condotto su *E. moshkovskii* a varie temperature può chiarire se le diverse velocità d'azione dipendano da reali differenze metaboliche tra le diverse specie di *Entamoeba* o siano semplici conseguenze di una generica influenza della temperatura sulle reazioni biochimiche. Ricerche in questo senso possono inoltre servire alla caratterizzazione di questa entamoeba rispetto alle altre. Anche l'osservazione della sensibilità ai farmaci può servire a questo scopo, visto che per supplire alla insufficienza dei classici metodi morfologici per la distinzione specifica delle suddette entamoebe si deve ricorrere a criteri ecologici, fisiologici, patologici ecc. (vedi DE CARNERI 1958 c).

Nel presente lavoro vengono studiate le velocità d'azione di 16 antiamebici su sospensioni di trofozoiti di *E. moshkovskii* incubati in terreno monofasico, in presenza di una flora batterica mista, alle temperature di 4°C, 26°C e 37°C.

PARTE SPERIMENTALE

Il ceppo di *E. moshkovskii* usato per i nostri studi è stato isolato dal Prof. AMARAL a San Paolo del Brasile, è stato portato in Germania dal Dr. MÜHLPFORDT e ci è stato gentilmente ceduto dal Dr. WESTPHAL del Tropeninstitut di Amburgo. I suoi trofozoiti si sviluppano vigorosamente a 26°C., in presenza di una flora batterica mista, nei vari terreni usati per la cultura di *E. histolytica;* si moltiplicano abbastanza bene a 37°C e sopravvivono più di 5 mesi a 4°C. Normalmente il ceppo è conservato in terreno di PAVLOVA (vedi sotto) mediante passaggi settimanali alla temperatura di 26°C.

Su questo ceppo fu determinata l'attività delle seguenti sostanze: Yatren, carbarsone, clorochina, pirimetamina, diidrostreptomicina, penicillina, bacitracina, eritromicina, clorotetraciclina (aureomicina), ossitetraciclina (terramicina), tetraciclina, D(—) treocloramfenicolo, L(+) treo-cloramfenicolo, tricomicina, emetina, fumagillina. Esse furono sciolte o sospese finemente, e poi diluite, in progressione geometrica di ragione 2, in provette da batteriologia contenenti 2 cc. di terreno di PAVLOVA (1938) modificato da JONES (1952), delle seguenti composizioni: Na_2 HPO_4 $2H_2$ 0 gr. 4,45 — KH_2 PO_4 gr. 1,135 — NaCl gr. 20 — estratto lievito Difco gr. 2,75 — H_2 0 dist. cc. 2750 — pH 7,2. Si sterilizza 30' a 115°C. Al momento dell'uso si aggiunge il 5% di siero di cavallo sterile e una punta di spatola di polvere di riso Difco sterilizzata 1 ora a 160°C.

Ai 2 cc. delle diluzioni delle sostanze in esame, contenenti già una sospensione di polvere di riso, si aggiungono 2 cc. di una sospensione di *E. moshkovskii* coltivata per 4 giorni a 26°C. in bottiglie di Roux da lt. 1, contenenti 300 cc. dello stesso terreno.

Le amebe nei 4 cc. risultanti sono circa 200.000 (conteggio in camera di Bürcher) ed i batteri associati circa 4 miliardi (conteggio secondo il roll tube method di Wilson, 1922). Si agita bene e tre doppie serie di provette vengono poste ad incubare a 4° C, 26° C e 37° C per 14 giorni.

Nelle provette incubate a 26°C e a 37°C può aver luogo una moltiplicazione dei trofozoiti, il cui numero nei controlli non supera però mai, alla fine degli esperimenti, i 500.000 per provetta.

A 4° C i trofozoiti non si moltiplicano, ma si mantengono estremamente mobili.

Dopo 30', 2h, 4h30', 7h30', 9h, 16h, 24h, 30h, 48h, 72h, 5g, 7g, 9g, 11g, 14g; di incubazione alle tre diverse temperature si eseguono letture al microscopio, a 125 e 500 ingrandimenti, prelevando per l'esame una piccola quantità del sedimento mediante una pipetta capillare, senza agitare. L'esame è considerato negativo quando nel campione prelevato, disposto su un vetrino porta-oggetti, coperto con coprioggetti e accuratamente esaminato, non vi è alcuna ameba che dimostri, per l'aspetto del citoplasma e sopratutto per la capacità di emettere pseudopodi, di essere viva.

La distinzione delle amebe già morte da quelle solo paralizzate è facilitata anche dal fatto che le prime degenerano rapidamente per autolisi e per l'attività della flora batterica, o di sistemi enzimatici da essa liberati.

E' importante che l'esame venga eseguito da personale esercitato. Se non si notano amebe vive, l'esame è esteso a tutto il sedimento; poichè la prova è eseguita in doppio, l'attività di una sostanza dopo un dato tempo per una data concentrazione viene stabilita dopo che l'esame è stato esteso anche alla provetta gemella. Se in una delle due provette è presente anche una sola ameba, la sostanza è considerata inattiva a quella concentrazione. Le determinazioni definitive furono precedute da prove orientative; nei casi più interessanti le prove furono ripetute più volte. La concordanza fra le varie prove fu in generale buona, nei limiti della variabilità riscontrata da altri ricercatori (Balamuth e Thompson, 1955). Nelle tabelle allegate vengono riportati, per ogni sostanza e temperatura, i dati relativi ad una sola determinazione, di solito eseguita in parallelo con altre sostanze partendo dallo stesso lotto di semina.

Si utilizza così per la misura dell'attività la dose sterilizzante.

Risultati

Nella Tabella 1 sono riportati i limiti dell'attività delle 16 sostanze studiate sui trofozoiti di *E. moshkovskii*, dopo progressivi periodi di incubazione alle temperature di 4°C, 26°C e 37°C. Questi trofozoiti a 26°C si comportano complessivamente in maniera simile a quelli di *E. invadens;* a 37°C reagiscono

TABELLA 1.

Attività su Entamoeba moshkovskii *in* μg */cc dopo progressivi periodi di incubazione a tre diverse temperature in terreno di Pavlova. Vedi dettagli tecnici nel testo.*

Sostanze	Temperatura	30'	2h	4h30'	7h30'	9h	16h	24h	30h	48h	72h	5 g	7 g	9 g	11 g	14 g
Yatren	4°C		>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	2000	2000	2000	1000	1000	500
	26°C		>4000	>4000	>4000	4000	4000	4000	2000	1000	1000	250	125	125	125	125
	37°C		>4000	2000	2000	1000	1000	250	250	250	125	62	62	62	62	62
Carbarsone	4°C		>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	4000	4000	4000	4000	4000	2000	2000	2000
	26°C		>4000	>4000	4000	4000	2000	1000	1000	1000	500	250	125	125	62	62
	37°C		>4000	4000	2000	1000	1000	1000	1000	1000	250	250	62	62	62	31
Clorochina	4°C								>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	26°C								>10000	>10000	10000	2500	2500	625	310	310
	37°C								>10000	2500	2500	310	310	310	310	310
Pirimetamina	4°C	> 4000	>4000	>4000	4000	4000	4000	4000	4000	2000	1000	1000	1000	500	500	500
	26°C	> 4000	>4000	2000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	37°C	> 4000	2000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500	125	62
Diidrostreptomicina	4°C									> 20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000
	26°C									> 20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000
	37°C									> 20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000
Penicillina	4°C				>20000	>20000							>20000	20000	20000	20000
	26°C				>20000	>20000							>20000	>20000	>20000	>20000
	37°C				>20000	20000							20000	20000	20000	20000
Bacitracina	4°C	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000		> 20000	>20000	>20000	>20000	>20000	20000	10000		10000
	26°C	>20000	>20000	>20000	>20000	20000		20000	10000	10000	10000	10000	10000	10000		10000
	37°C	>20000	20000	20000	10000	10000		10000	10000	10000	5000	5000	5000	5000		5000
Eritromicina	4°C	>10000	10000	10000	10000		10000	5000						5000	5000	1250
	26°C	>10000	10000	10000	10000		10000	10000						10000	5000	5000
	37°C	>10000	10000	5000	2500		2500	2500						2500	2500	1250

D (–) treo-cloramfenicolo	4°C			> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	2000			2000	1000
	26°C			> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	2000	2000	1000	1000	1000			1000	1000
	37°C			> 2000	2000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500			500	500
L (+) treo-cloramfenicolo	4°C			> 2000	> 2000	> 2000	> 2000				> 2000	2000	2000	1000		1000
	26°C			> 2000	> 2000	> 2000	2000				2000	2000	1000	1000		1000
	37°C			> 2000	2000	1000	1000				1000	1000	1000	500		500
Clorotetraciclina	4°C	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	2000	1000		1000	500
	26°C	2000	1000	500	250	250	250	125	125	125	125	125	125		125	125
	37°C	2000	500	250	250	125	125	125	125	62	62	62	62		62	62
Ossitetraciclina	4°C	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000		> 4000	> 4000	4000		4000	4000		4000
	26°C	> 4000	> 4000	2000	1000	1000	500		500	500	500		500	500		500
	37°C	> 4000	4000	500	500	500	500		500	250	250		250	125		125
Tetraciclina	4°C		> 4000	> 4000					> 4000	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000		> 4000
	26°C		> 4000	> 4000					> 4000	> 4000	1000	500	500	250		250
	37°C		> 4000	500					500	250	250	125	62	62		62
Tricomicina	4°C	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	500	125	62	62	62	31	8		8	8
	26°C	> 1000	> 1000	1000	500	62	62	16	16	16	16	8	8		8	8
	37°C	> 1000	1000	500	500	62	31	16	16	16	8	8	8		8	4
Emetina	4°C									> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
	26°C									> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	500	250
	37°C									> 1000	500	250	250	62	16	4
Fumagillina	4°C								> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000			> 1000
	26°C								> 1000	> 1000	> 1000	100	50			50
	37°C								> 1000	50	50	50	50			50

piuttosto in maniera simile a quelli di *E. histolytica* (vedi per i confronti DE CARNERI, 1957, 1958d).

E. moshkovskii è molto più sensibile delle altre due specie al carbarsone, allo yatren ed anche alla clorochina, bacitracina, eritromicina, tetraciclina, tricomicina.

L'attività della pirimetamina a 26°C è un po' più rapida ma, alla fine, della stessa entità che su *E. invadens* (1000 μg/cc). A 37°C dopo 3 giorni l'attività (1000 μg/cc) è inferiore a quella riscontrata sulla maggior parte dei ceppi di *E. histolytica;* questo è a mio giudizio il limite massimo di tempo utilizzabile per determinazioni in vitro su quest'ultima specie, i cui trofozoiti degenerano in seguito per invecchiamento. Dopo 14 giorni a 37°C la pirimetamina è però attiva su *E. moshkovskii* fino alla concentrazione di 125 μg/cc.

La sensibilità alla diidrostreptomicina e alla penicillina è anche qui trascurabile (>20.000 μg/cc a 26°C e 20.000 μg/cc a 37°C).

La clorotetraciclina (aureomicina) e la ossitetraciclina (terramicina) a 26°C hanno una azione assai simile su *E. invadens* e su *E. moshkovskii.* La prima sostanza è più attiva della seconda su entrambe le specie (125 μg/cc dopo 16 - 24 ore); la ossitetraciclina ha alla fine una identica attività su entrambe le specie, però agisce più precocemente su *E. moshkovskii* (500 μg/cc dopo 16h) che non su *E. invadens* (500 μg/cc dopo 14g). A 37°C l'attività delle due sostanze su *E. moshkovskii* è più marcata (62 e 125 μg/cc) e si avvicina a quella riscontrata, nel corso degli studi sopracitati, sui trofozoiti di alcuni ceppi di *E. histolytica.*

I due isomeri ottici del treo-cloramfenicolo hanno su *E. moshkovskii* attività sostanzialmente identiche, comprese tra i 1000 e i 500 μg/cc, come era già stato constatato sulle altre due specie (vedi DE CARNERI, 1956).

L'azione dell'emetina e della fumagillina è particolarmente meritevole d'attenzione. La prima sostanza a 26°C rivela qualche attività su *E. moshkovskii* solo dopo 9 giorni (1000 μg/cc) e dopo 14g. è attiva fino a 250 μ g/cc. Su *E. invadens* è attiva a 2000 μ g/cc dopo 4g. e a 500 μg/cc dopo 14. A 37°C l'emetina si rivela attiva dopo 3 giorni sulla prima specie (500 μ g/cc) e l'attività aumenta fino al 14° giorno (4 μ g/cc). Su *E. histolytica,* ad es. sul ceppo F22, che ha un comportamento medio rispetto ad altri ceppi della stessa specie, l'attività inizia a manifestarsi dopo 30 ore (100 μg/cc) e dopo 40 h. si stabilizza sui 12,5 μg/cc.

La fumagillina a 26°C si rivela attiva su *E. moshkovskii* dopo 5 g. (100 μg/cc) e tra il 7° e il 14° giorno l'attività resta stabilizzata sui 50 μg/cc. Su *E. invadens* si rivela attiva dopo 4 giorni (500 μ g/cc) e dopo 6 giorni l'attività si stabilizza sui 3 μg/cc. A 37°C *E. moshkovskii* inizia più rapidamente a denunciare l'azione di questo antibiotico (50 μg/cc dopo 48 ore), ricordando il comportamento del ceppo F22 di *E. histolytica* (100 μg/cc dopo 30 ore e 12,5 μg/cc dopo 48 h).

La velocità dell'azione amebicida della fumagillina e, in grado minore, quella dell'emetina mostrano dunque di variare quasi più in base alla temperatura che in base alla specie di *Entamoeba* studiata. Ciò è ancor più evidente se si considera che dopo 14 giorni alla temperatura di 4°C le due sostanze sono inattive su *E. moshkovskii* alla concentrazione di 1000 μg/cc.

A 4°C anche la clorochina e la tetraciclina sono inattive. Per tutti gli altri farmaci, ad eccezione della eritromicina, è visibile a questa temperatura un rallentamento dell'azione, non però sempre una diminuzione della sua entità allo scadere del quattordicesimo giorno. La tricomicina con 8 g/cc a 4°C e a 26°C, i due isomeri ottici del cloroamfenicolo con 1000 μg/cc, la bacitracina con 10.000 μg/cc alle due stesse temperature ne sono un esempio. Pirimetamina, eritromicina e penicillina sono addirittura più attive a 4°C che a 26°C. Questo fatto si può spiegare considerando che la temperatura intermedia di 26°C è quella ottimale per i trofozoiti di *E. moshkovskii*. A questa temperatura essi possono reagire meglio quando l'azione sfavorevole di certi farmaci inizia a manifestarsi; le temperature di 4°C e di 37°C in queste circostanze si rivelano troppo vicine ai limiti inferiore e superiore della zona entro cui i trofozoiti possono sopravvivere.

In conclusione, l'attività di numerosi farmaci su *E. moshkovskii* dipende largamente dalla temperatura, ricordando a 26°C quella su *E. invadens* e a 37°C quella su *E. histolytica*. Prescindendo dalle influenze della temperatura, la sensibilità ai farmaci di queste tre specie segue linee grosso modo parallele, il che depone a favore di una fondamentale somiglianza del loro metabolismo. Entro questo schema generale corrispondente, si notano nei singoli casi notevoli divergenze. Come sopra è stato detto, questo ceppo di *E. moshkovskii* è caratterizzato da una sensibilità verso parecchi farmaci — carbarsone, yatren ecc. — nettamente maggiore di quella delle altre due specie. I dati qui riportati non si possono tuttavia considerare del tutto sufficienti per una fine differenziazione, visto che, come ho messo in evidenza studiando quattro ceppi di *E. histolytica* (de Carneri, 1958d), le differenze di sensibilità ai farmaci tra vari ceppi di una stessa specie di *Entamoeba* possono essere assai ampie. Non mi è stato però possibile procurarmi altri ceppi dell'entamoeba in questione; le ricerche microscopiche e culturali eseguite su fanghi di sedimentazione di acque di scarico della zona di Milano mi hanno fornito numerosi esemplari di protozoi dell'ordine Amoebina, ma non cisti o trofozoiti di *Entamoeba moshkovskii*.

RIASSUNTO

I trofozoiti di un ceppo del protozoo a vita libera *Entamoeba moshkovskii*, isolato a San Paolo del Brasile da fanghi di sedimentazione di acque di scarico, si mantengono attivamente mobili dopo 5 mesi a +4°C, hanno una temperatura ottimale di sviluppo a 26°C e si sviluppano anche a 37°C in vari terreni usati per la cultura di *Entamoeba histolytica* ed *E. invadens*. A queste tre temperature è stata studiata la azione in vitro di 16 antibiotici e chemioterapici su culture della prima specie, in presenza di una flora batterica mista non identificata, usando un terreno « monofasico » a base di estratto di lievito 0,1%, siero di cavallo 5%, NaCl, tampone di fosfati pH 7,2 e polvere di riso. Le osservazioni microscopiche sono state eseguite dopo 15 intervalli di tempo compresi tra 30' e 14 giorni di incubazione. I risultati vengono paragonati con quelli ottenuti in occasione di precedenti studi condotti sulle altre due specie sopra ricordate. *E. moshkovskii* è più sensibile delle altre all'azione del carbarsone, yatren, clorochina, bacitracina, eritromicina, tetraciclina, tricomicina. La pirimetamina a 26°C ha attività finali identiche su *E. moshkovskii* e su *E. invadens*, parassita dei serpenti che non può essere coltivato a temperature molto diverse da questa; a 37°C è all'inizio più attiva su alcuni ceppi di *E. histolytica* che non su *E. moshkovskii*, la quale però dopo 14 giorni è sensibile fino a 62 μg/cc. I due isomeri ottici del cloroamfenicolo nonchè la clorotetraciclina e la ossitetraciclina hanno a 26°C attività finali identiche su *E. moshkvskii* e su *E. invadens;* a 37°C attività finali sulla prima specie suppergiù corrispondenti a quelle esplicate su vari ceppi di *E. histolytica*. Diidrostreptomicina e penicillina sono praticamente inattive.

L'aumento della temperatura ha una modesta influenza sulla velocità d'azione della tricomicina e una influenza assai maggiore sull'ázione di altre sostanze, in special modo fumagillina ed emetina. Queste due ultime con la clorochina e la tetraciclina non sono attive, alle dosi massime studiate, dopo 14 giorni a 4°C. Nel complesso la velocità e l'entità dell'azione dei farmaci su *E. moshkovskii* a 26°C ricorda l'azione esibita su *E. invadens* alla stessa temperatura; a 37°C invece si accosta più all'azione esibita, alla stessa temperatura, su *E. histolytica*.

I risultati, raccolti in una tabella, vengono discussi.

SUMMARY

Trophozoites of a strain of the free living protozoon *Entamoeba moshkovskii* isolated at Sao Paulo, Brazil, from sewage have remained actively motile after 5 months at +4°C., have an optimum growth temperature of 26°C and develop also at 37°C in various media used for the culture of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens* The in vitro action of 16 antibiotics and chemotherapeutics on the first species has been studied at these three temperatures, in the presence of a mixed unidentified bacterial flora, using a monophasic medium based on 0,1% yeast extract, 5% horse serum, NaCl, phosphate buffer pH 7,2 and rice powder. Microscopic observations were carried out fifteen times at intervals ranging from 30' to 14 days. The results are compared to those obtained on occasion of previous studies carried out on the other two above-mentioned strains. *E. moshkovskii* is more sensitive than the others to the action of carbarsone, yatren, chloroquine, bacitracin, erythromycin, tetracycline and trichomycin. Pyrimethamine at 26°C has a final identical action on *E. moshkovskii* and *E. invadens*. At 37°C it is at first more active on some strains of *E. histolytica*, although *E. moshkovskii* is sensitive to 62 μg/cc after 14 days. The two optical isomers of chloramphenicol as well as tetracycline and oxytetracycline have identical final activity on *E. moshkovskii* and *E. invadens* at 26°C. At 37°C the final activity on the

first species is almost the same as that exerted on the various strains of *E. histolytica*. Dihydrostreptomycin and penicillin are practically inactive.

Increase of temperature has a sligt influence on the velocity of action of trichomycin and a much greater one on the action of other substances, particularly fumagillin and emetine. These last two, along with chloroquine and tetracycline, are not active at the higher doses studied, even after 14 days, at 4°C. On the whole, the speed and the degree of the action of the drugs on *E. moshkovskii* at 26°C recalls the action on *E. invadens* at the same temperature. On the other hand, at 37°C the action is more similar to that on *E. histolytica* at the same temperature.

The results, collected in a table, are then discussed.

BIBLIOGRAFIA

Amaral A. D. F. e Azzi Lear R. (1949): Sôbre uma Endamoeba semelhante à *Endamoeba histolytica* encontrada em material de esgôto, *Rev. paul.st. Med. 34*, 173.

Balamuth W. e Tompson P. E. (1955): Comparative studies on Amebae and amebicides, *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, *2*, 277.

de Carneri I. (1956): Azione dei due antipodi ottici del cloramfenicolo e dei Treo-1.P. nitrofenil-2, amino-1,3-propandioli enantiomorfi su alcuni protozoi parassiti, *Il Farmaco*, *11*, 926.

de Carneri I. (1957): *Entamoeba invadens* Rodhain, 1934, ed *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903; studio comparato della sensibilità in vitro a 16 farmaci, e problemi connessi con l'uso della prima come modello per ricerche di chemioterapia dell'amebiasi, *Riv. di Parass.*, *18*, 133.

de Carneri I. (1958a): (*in corso di stampa*).

de Carneri (1958b): Spezifität und Geschwindigkeit der Wirkung zweier verschiedener Reihen von Dichloracetamid-Derivaten auf 3 Entamoeba-Arten, *Ztschr. Tropenmed. u. Parasitol. 9*, 32.

de Carneri I. (1958c): Studi sulla virulenza di *Entamoeba histolytica*. I. Variazioni cicliche della virulenza di un ceppo di *Entamoeba histolytica* nell'infezione intestinale del ratto albino in seguito a passaggi seriali in vitro e nel fegato di *Cricetus auratus*, *Riv. di Parass. 19*, 7.

de Carneri I. (1958d): The « in vitro » sensitivity of four strains of *Entamoeba histolytica* after various periods of incubation, *Arch. Internat. Pharmacodyn. Ther. 113*, 273.

Gnezdilov V. G. (1947): (Materiali sulla distribuzione geografica, l'epidemiologia e la profilassi dell'amebiasi) (In russo), *Med. Parasit. & Parasitic. Dis.*, Mosca, *16*, 13.

Jones W. R. (1952): Experimental attempt to induce drug- resistance in *Entamoeba histolytica*, *J. Exp. Parasit.*, *1*, 118.

Neal R. A. (1950): A species of *Entamoeba* from sewage, *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, *44*, 9.

Neal R. A. (1953): Studies on the morphology and biology of *Entamoeba moshvkovskii* Tshalaia, 1941, *Parasitology*, *43*, 253.

Pavlova E. A. (1938): Sur les méthodes de la culture d'*Entamoeba histolytica*, *Med. Parasit. & Parasitic. Dis.* Mosca, 7, 224. (in russo: riass. in francese a pag. 227). Riassunto in *Trop. Dis. Bull.* 1939, *36*, 286.

Tshalaia L. E. (1947): (Contributo allo studio di *Entamoeba moshkovskii*) (in russo) *Med. Parasit. & Parasitic. Dis.* Mosca, *16*, 66. Riassunto in *Abstr. World Med.* 1948, *4*, 110.

Wilson G. S. (1922): The proportion of viable bacteria in young cultures with especial reference to the technique employed in counting, *J. Bact.*, 7, 405.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 2 Aprile 1958

NOTIZIE SUL PARASSITISMO INTESTINALE DELL'UOMO NEL TERRITORIO DEL PARCO NAZIONALE D'ABRUZZO

MARCELLO RICCI (*)

Le indagini di cui si riferirà nella presente nota rientrano nel quadro del piano di ricerche volte a delimitare nei suoi giusti limiti la diffusione e distribuzione del parassitismo intestinale dell'uomo in Italia, in atto da alcuni anni ad opera dello scrivente, precisamente rappresentando il campione di un ambiente montano.

Esse sono state effettuate nell'estate del 1953 su invito della Presidenza del Parco Nazionale d'Abruzzo, per suo conto direttamente interessata in quanto le ricerche stesse costituivano parte del piano da tale Ente predisposto onde addivenire alla più profonda conoscenza di ogni aspetto della vita nel territorio del Parco. Mi è gradito ringraziare qui l'Amministrazione del Parco Nazionale d'Abruzzo, in particolare nelle persone dell'allora presidente Dott. Remo Scarpitti e del direttore Avv. Francesco Saltarelli, sia per l'invito che per tutti gli aiuti ed agevolazioni datemi nel corso delle ricerche.

Per circostanze varie non è stato possibile allo scrivente di rendere pubblici prima d'ora i risultati delle sue indagini; anche se è trascorso del tempo essi vengono però ritenuti ugualmente meritevoli di pubblicazione rappresentando il primo contributo circa le condizioni del parassitismo intestinale dell'uomo che si abbia per la zona studiata.

***

Sono state prese in esame le popolazioni dei seguenti Comuni: Barrea, Civitellalfedena, Opi, Pescasseroli, Villetta-Barrea. Con le metodiche usate nelle similari precedenti ricerche (1) l'indagine è stata basata: 1, per i soggetti da 1 a 12 anni, su un unico prelevamento con il nastro di cellofan adesivo (metodo di Graham) per la diagnosi di ossiuriasi, e su un esame delle feci; 2, per i soggetti oltre i 12 anni, sul solo esame delle feci.

(*) *Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di parassitologia, Roma.*

L'esposizione dei dati raccolti verrà divisa nelle seguenti parti: I) diffusione e distribuzione dell'ossiuriasi nella popolazione infantile; II) diffusione e distribuzione delle altre parassitosi intestinali: *a*, nella popolazione infantile e *b*, nella popolazione adulta; in altri due paragrafi, *c* e *d*, di questa seconda parte saranno poi esposte le considerazioni sulla diffusione e distribuzione delle specie di parassiti repertate, ed i dati sulle associazioni parassitarie rilevate.

I. Diffusione e distribuzione dell'ossiuriasi nella popolazione infantile

Materiale.

Sono stati complessivamente esaminati, mediante una sola applicazione del nastro di cellofan adesivo secondo il metodo di Graham, 653 bambini da oltre 1 anno a 12 anni, e precisamente 315 maschi e 338 femmine.

I dati relativi alla distribuzione per sesso e per anno di età del materiale esaminato sono globalmente indicati in Tabella 1; nella Tabella 2 sono invece riportati i dati relativi ai soggetti esaminati in ciascun Comune e quelli globali per sesso e per classi di età di tre anni.

Tabella 1.

Distribuzione per sesso e per età dei soggetti esaminati con il nastro di cellofan adesivo (metodo di Graham).

Anni	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Totale
Maschi . . .	19	32	45	41	33	32	22	20	21	15	16	19	315
Femmine . .	24	37	44	39	31	36	31	12	31	20	22	11	338
Totale . .	43	69	89	80	64	68	53	32	52	35	38	30	653

Essendo nel periodo in cui si è svolta la ricerca già chiuse le Scuole elementari la raccolta dei soggetti — e ciò vale anche per la parte relativa alle parassitosi intestinali — è stata operata grazie al valido interessamento degli Ufficiali Sanitari dei Comuni interessati, cui rinnovo pertanto qui il più vivo ringraziamento.

Risultati.

Sui 653 soggetti esaminati ne sono risultati parassitati 212, pari al 32,47%. I dati analitici sul grado di infestazione rilevato per ciascun anno di età e per sesso nella popolazione globale sono raccolti nella Tabella 3; quelli per le sin-

gole località, per classi di età di tre anni, per sesso e complessivi, nonchè per classi di età di tre anni e per sesso della popolazione totale esaminata sono riuniti nella Tabella 4.

Dall'esame di tali dati possono trarsi alcune considerazioni.

TABELLA 2.

Distribuzione per Comune, per sesso e per classi di età di 3 anni, dei soggetti esaminati con il nastro di cellofan adesivo (metodo di Graham)

Anni		1-3	4-6	7-9	10-12	1-12	Totale
Barrea	maschi	14	17	8	5	44	95
	femmine	17	15	8	11	51	
Civitellalfedena	maschi	17	16	5	10	48	87
	femmine	13	15	3	8	39	
Opi	maschi	23	17	11	12	63	131
	femmine	17	28	16	7	68	
Pescasseroli	maschi	14	31	11	6	62	149
	femmine	20	21	25	21	87	
Villetta-Barrea	maschi	28	25	28	17	98	191
	femmine	38	27	22	6	93	
Parco Nazionale d'Abruzzo .	maschi	96	106	63	50	315	
	femmine	105	106	74	53	338	
	Totale	201	212	137	103	653	

TABELLA 3.

Diffusione percentuale dell'ossiuriasi in ciascun anno di età, per sesso e totali.

Anni	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Totale
maschi	5,26	6,25	15,56	34,15	36,36	34,38	40,91	40,00	52,38	53,33	43,75	21,02	29,84
femmine	8,33	16,22	27,27	30,7[illegible]	41,94	41,67	45,16	50,00	54,84	35,00	45,45	36,36	34,91
Totale . . .	6,98	11,59	21,35	32,50	39,06	38,24	43,40	43,75	53,85	42,86	44,74	26,67	32,47

TABELLA 4.

Diffusione percentuale dell'ossiuriasi in ciascun Comune per sesso e per classi di età di 3 anni, e totali.

Anni		1-3	4-6	7-9	10-12	1-12
Barrea	maschi	14,29	41,18	50,00	40,00	34,09
	femmine	41,18	66,67	75,00	63,63	58,82
	Totale	29,03	53,13	62,50	56,25	47,37
Civitellalfedena	maschi	5,88	37,50	80,00	20,00	27,08
	femmine	15,38	53,33	100,00	—	33,33
	Totale	10,00	45,16	87,50	11,11	29,89
Opi	maschi	13,04	41,18	18,18	25,00	23,81
	femmine	11,76	21,43	37,50	42,84	25,00
	Totale	12,50	28,89	29,63	31,58	24,43
Pescasseroli	maschi	7,14	22,58	45,45	50,00	25,81
	femmine	10,00	33,33	32,00	28,60	26,44
	Totale	8,82	26,92	36,11	33,33	26,17
Villetta Barrea	maschi	10,71	40,00	46,43	52,94	35,71
	femmine	18,42	33,33	63,64	83,33	37,63
	Totale	15,15	36,54	47,37	60,87	36,65
Parco Nazionale d'Abruzzo.	maschi	10.42	34,91	44,44	38,00	29,84
	femmine	19,05	37,74	50,00	39,62	34,91
	Totale	14,93	36,32	47,45	38,83	32,47

1) Si può rilevare anzitutto come il grado di infestazione della popolazione totale esaminata sia relativamente poco elevato, se confrontato con quello osservato nella maggior parte delle similari ricerche. Vero è che ad abbassare il valore percentuale contribuisce certamente in parte, come ora si vedrà, la prevalenza numerica dei soggetti di 1-5 anni; ma anche considerando ciò il valore stesso rimane piuttosto basso, e la popolazione deve quindi ritenersi relativamente poco infestata da *Enterobius vermicularis*.

2) Si nota anche in questa occasione un piuttosto regolare incremento della diffusione percentuale della parassitosi con il progredire dell'età da 1 fino a 5 anni, mentre dopo questa età i valori di ciascun anno si mantengono sostanzialmente assai prossimi.

Tale progressione del grado di infestazione con l'età si rende maggiormente evidente considerando i valori totali per classi di età di tre anni, e soprattutto confrontando le percentuali di infestazione del complesso dei soggetti di 1-5 anni e del complesso di quelli di 6-12 anni: sia per il complesso dei soggetti che i soli maschi o le sole femmine si osservano infatti in questo caso D% statisticamente significative (Tabella 5).

TABELLA 5.

Confronto della diffusione della ossiuriasi tra i soggetti di 1-5 e quelli di 6-12 anni.

	Soggetti di 1-5 anni		Soggetti di 6 12 anni		D%	t ($n > 30$)
	N° esaminati	% parassitati	N° esaminati	% parassitati		
maschi	170	21,18	145	40,00	18,82	3,669
femmine	175	25,71	163	44,79	19,08	3,665
totale . . .	345	23,48	308	42,53	19,05	5,262

$P < 0{,}01$ per $n > 30$ e $t > 2{,}575$

Il massimo grado di diffusione dell'ossiuriasi si rileva in corrispondenza dei 9 anni di età. Una brusca diminuzione del grado di infestazione si nota nel complesso dei soggetti di 12 anni; la diminuzione è presentata sia dalle femmine che dai maschi, ma pare più accentuata in questi ultimi; ciò pur tenendo presenti le debite limitazioni inerenti allo scarso numero dei soggetti esaminati, potrebbe trovare la sua ragione nell'abbandono dell'ambiente scolastico, che appunto normalmente si verifica intorno a questa età, e nel contemporaneo

acquisto di attività, specialmente la pastorizia, che costringono ad una vita più isolata, e pertanto a minori possibilità di infestazione.

3) Dai risultati globali risulta una modica D% del grado di infestazione tra i due sessi, differenza che si mantiene anche considerando partitamente i soggetti di 1-5 e 6-12 anni. Tutte tali D% risultano però non statisticamente significative (Tabella 6).

TABELLA 6.

Confronto tra la diffusione della ossiuriasi nei due sessi.

	maschi		femmine		D%	t ($n > 30$)
	N° esaminati	% parassitati	N° esaminati	% parassitati		
soggetti di 1-5 anni	170	21,18	175	25,71	4,53	0,948
soggetti di 6-12 anni	145	40,00	163	44,79	4,79	0,851
totale . . .	315	29,84	338	34,91	5,07	1,389

$P > 0{,}01$ per $n > 30$ e $t > 2{,}575$

4) Pochi elementi possono trarsi dall'analisi dei valori per maschi e per femmine delle classi di età di tre anni per ogni singolo Comune: le rilevanti disparità nella consistenza numerica dei singoli gruppi, accoppiata alla esiguità di parecchi di essi, non consente infatti di attribuire valore alle sia pure, anzi probabilmente proprio per questo, notevoli differenze delle percentuali di diffusione.

I totali per classi di età di ciascun comune ripetono invece abbastanza regolarmente il comportamento dianzi segnalato dell'incremento della diffusione dell'ossiuriasi con l'avanzare dell'età.

Dai totali del complesso dei soggetti esaminati emerge una sensibile differenza della frequenza dell'infestazione tra i diversi Comuni: Barrea presenta l'indice percentuale più alto, seguita a distanza da Villetta-Barrea, mentre le altre tre località sono più o meno su uno stesso piano. Sottoponendo i dati alla prova di omogeneità secondo Brandt e Snedecor si ricava un valore di χ^2 di 17,900 che per $n = 4$ dà $P < 0{,}01$, probativo cioè, della eterogeneità degli elementi saggiati. I valori del t ricavati dai possibili confronti tra i valori percentuali di ciascuna località (Tabella 7) confermano: 1, che la situazione presentata da Barrea è nettamente differente da quelle presenti a Civitellalfedena, Opi e Pescasseroli, mentre non è differenziabile da quella di Villetta - Bar-

rea; 2, che la situazione presente in quest'ultima località è differente almeno da quelle di Opi e di Pescasseroli; 3, che identica è invece la situazione presente nelle altre tre località. Se grazie a quest'ultimo fatto si considerano cumulativamente Civitellalfedena, Opi e Pescasseroli e si pone a confronto la percentuale di infestazione così ottenuta (26,43%, pari a 97 parassitati su 367 esaminati) con quelle di Barrea e di Villetta-Barrea, si ottiene nel primo caso $t = 3{,}733$, per cui è $P < 0{,}01$, e nel secondo $t = 2{,}451$, per cui P è tra 0,02 e 0,01, e cioè la conferma che ambedue queste località sono da considerare differenti dalle altre tre per quanto si riferisce al grado di diffusione dell'ossiuriasi.

Tabella 7.

Confronto tra le percentuali di diffusione della ossiuriasi dei cinque Comuni studiati: valori di t.

	Civitellalfedena	Opi	Pescasseroli	Villetta-Barrea
Barrea	2,465 (1)	3,613	3,387	1,732
Civitellalfedena	—	0,885	0,612	1,116
Opi	—	—	0,335	2,387 (1)
Pescasseroli	—	—	—	2,096 (2)

$P < 0{,}01$ per $n > 30$ e $t > 2{,}575$

(1) P è tra 0,02 e 0,01.
(2) P è tra 0,05 e 0,02.

Conclusioni.

Da quanto sopra riferito possono essere tratte le seguenti conclusioni:

nei Comuni esaminati del Parco Nazionale d'Abruzzo l'ossiuriasi presenta un grado relativamente basso di diffusione nella popolazione infantile;

nessuna differenza appare esistere tra la diffusione dell'infestazione nei due sessi;

precise differenze nel grado di infestazione si rilevano in relazione all'età, i soggetti sotto i 6 anni risultando parassitati in misura nettamente minore che non quelli oltre tale età;

la diffusione dell'ossiuriasi nei diversi centri non risulta uniforme, il grado di infestazione di Barrea e Villetta-Barrea essendo più elevato di quello, omogeneo, presente negli altri tre Comuni.

II. Diffusione e distribuzione delle altre parassitosi intestinali

Materiale.

Sono stati complessivamente esaminati 453 individui, 183 maschi e 270 femmine, di età da oltre 1 a 74 anni, e precisamente: 75 a Barrea, 63 a Civitellalfedena, 17 a Opi, 218 a Pescasseroli e 80 a Villetta-Barrea. La composizione per età della popolazione globale esaminata è analiticamente riportata in Tab. 8.

Tabella 8.

Distribuzione per sesso e per età dei soggetti sottoposti ad esame delle feci.

anni	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1-12
maschi	6	14	17	9	12	13	10	6	6	5	6	9	113
femmine	7	14	21	12	13	6	11	6	11	6	10	7	124
totale . . .	13	28	38	21	25	19	21	12	17	11	16	16	237

anni	13-20	21-30	31-40	41-50	50-60	61-70	70. .	13...
maschi	14	8	12	22	12	1	1	70
femmine.	34	32	33	31	5	5	2	146
totale	48	40	45	53	17	6	3	216

Risultati.

Come premesso, ed in analogia ai precedenti similari lavori, si ritiene opportuno di trattare partitamente dei risultati ottenuti per la popolazione da 1 a 12 anni e per quella oltre i 12 anni. Cumulativamente verranno invece esposte le considerazioni sulle specie parassite repertate, e riferiti i dati sul poliparassitismo.

a. *Diffusione e distribuzione delle parassitosi intestinali nella popolazione infantile.*

La diffusione del parassitismo intestinale, quale risulta dall'esame delle feci, appare nei soggetti di 1-12 anni alquanto elevata. Sui 237 soggetti esaminati ne sono infatti risultati positivi ben 184 pari al 77,64%; di questi 87 (47,28%) albergavano un solo parassita, mentre nei rimanenti 97 (52,72%) il numero dei parassiti andava da 2 a 5.

TABELLA 9.

Diffusione percentuale del parassitismo intestinale nella popolazione infantile del Parco Nazionale d'Abruzzo.

	n. soggetti esaminati	soggetti parassitati	*Entamoeba coli*	*Entamoeba histolytica*	*Endolimax nana*	*Jodamoeba bütschlii*	*Chilomastix mesnili*	*Giardia intestinalis*	*Ascaris lumbricoides*	*Enterobius vermicularis*	*Trichuris trichiura*
1. Popolazione totale esaminata											
a) dati globali	237	77,64	14,77	0,42	2,11	7,17	0,42	30,38	40,08	0,84	42,19
b) per sesso											
maschi	113	77,88	14,16	0,88	0,88	6,19	—	31,86	38,94	0,88	45,13
femmine	124	77,42	15,32	—	3,23	8,06	0,81	29,03	41,13	0,81	39,52
c) per classi di età di 3 anni											
1-3	79	59,49	2,53	—	—	2,53	—	40,51	18,99	1,27	13,92
4-6	65	86,15	16,92	—	1,54	1,54	1,54	36,92	41,54	—	60,00
7-9	50	90,00	28,00	—	8,00	8,00	—	24,00	64,00	2,00	54,00
10-12	43	83,72	18,60	2,33	—	23,26	—	9,30	48,84	—	53,49
d) per soggetti di 1-5 e 6-12 anni											
1-5	125	68,00	4,80	—	—	2,40	0,80	39,20	28,80	0,80	25,60
6-12	112	88,39	25,89	0,89	4,46	12,50	—	20,54	52,68	0,89	60,71
2. Popolazione totale dei cinque Comuni											
Barrea	35	45,71	22,86	—	—	2,86	—	22,86	14,29	2,86	20,00
Civitellalfedena . .	45	77,78	6,67	—	—	2,22	—	40,00	35,56	2,22	28,89
Opi	11	72,73	—	—	9,09	9,09	—	36,36	36,36	—	36,36
Pescasseroli . . .	119	86,44	13,45	—	3,36	7,56	0,84	29,41	49,58	—	50,42
Villetta-Barrea . .	27	81,48	29,63	3,70	—	18,52	—	25,93	40,74	—	59,26

Sono state complessivamente repertate nove specie di parassiti, di cui 6 Protozoi: *Entamoeba coli, Entamoeba histolytica, Endolimax nana, Jodamoeba bütschlii, Chilomastix mesnili, Giardia intestinalis*, e 3 Elminti: *Ascaris lumbricoides, Enterobius vermicularis, Trichuris trichiura*. Nella Tabella 9 sono indicate le percentuali di frequenza di ciascuna di esse: 1, nella popolazione totale esaminata: *a*, considerata globalmente, *b*, per sesso, *c*, per classi di età di tre anni, *d*, per soggetti di 1-5 e 6-12 anni; 2, nella popolazione totale di ciascun Comune studiato.

Rinviando a più innanzi l'esposizione delle considerazioni che possono essere fatte circa la diffusione di ciascuna specie parassita, dai dati di tale tabella emergono alcuni elementi meritevoli di segnalazione.

1) Nei riguardi del sesso dei soggetti identica risulta nei maschi e nelle femmine sia la diffusione del parassitismo in generale sia quella di ciascuna specie parassita. Questo fatto autorizza ovviamente la elaborazione di tutti gli altri dati cumulativamente, senza cioè dover tener conto del sesso dei soggetti.

2) Una precisa influenza sulla diffusione delle parassitosi intestinali risulta invece essere esercitata dall'età dei soggetti. Già sottoponendo alla prova di omogeneità i dati relativi alle classi di tre anni si ottengono infatti, sia nei confronti della diffusione del parassitismo in generale che per i singoli parassiti — la prova è naturalmente limitata alle sole specie più largamente rappresentate, — valori altamente significativi di χ^2, riportati in Tabella 10, che provano la eterogeneità dei quattro gruppi considerati, e quindi la diversa dif-

TABELLA 10.

Prova della omogeneità tra le classi di età di tre anni della popolazione infantile nei riguardi del parassitismo in generale e di alcuni parassiti: valori di χ^2.

soggetti parassitati	*E. coli*	*J. bütschlii*	*G. intestinalis*	*A. lumbricoides*	*T. trichiura*
23,155	16,960	20,708	15,000	27,867	39,402

$P < 0{,}01$ per $n = 3$ e $\chi^2 > 11{,}345$

fusione del parassitismo tra essi. Tale diversa diffusione si rende poi maggiormente evidente confrontando i dati relativi ai soggetti di 1-5 e 6-12 anni: tutte le D% che si osservano risultano al vaglio del *t* di Student di piena significatività statistica (Tabella 11), per cui si può concludere che sia il parassitismo in generale che i singoli parassiti considerati presentano effettivamente diversa diffusione in relazione all'età.

TABELLA 11.

Confronto tra soggetti di 1-5 e 6-12 anni nei riguardi del parassitismo in generale e di alcuni parassiti: valori di t.

soggetti parassitati	*E. coli*	*J. bütschlii*	*G. intestinalis*	*A. lumbricoides*	*T. trichiura*
3,959	4,689	3,061	3,233	3,845	5,813

$P < 0{,}01$ per $n > 30$ e $t > 2{,}575$

3) La frequenza del parassitismo in generale appare anche differente nei vari centri studiati, e l'osservazione trova conferma nel valore del χ^2 ricavato dalla prova di omogeneità tra i cinque Comuni (Tabella 12), appunto probativo della eterogeneità di essi. Il confronto tra le percentuali presentate da ciascun centro dimostra, analogamente a quanto verificato per la diffusione della ossiuriasi, che di tale eterogeneità è soprattutto responsabile Barrea: Le D% che si osservano tra essa e Civitellalfedena, Pescasseroli e Villetta-Barrea sono infatti tutte statisticamente significative, mentre la non significatività nei confronti di Opi è presumibilmente riferibile allo scarso numero di soggetti esaminati in questa località (Tab. 13). A conferma di ciò si può ancora

TABELLA 12.

Prova della omogeneità tra i diversi Comuni nei riguardi del parassitismo in generale e di alcuni parassiti, per la popolazione infantile: valori di χ^2.

soggetti parassitati	*E. coli*	*J. bütschlii*	*G. intestinalis*	*A. lumbricoides*	*T. trichiura*
25,862	10,833	7,866	3,316	18,804	21,070

$P > 0{,}01$ per $n = 4$ e $\chi^2 > 13{,}277$

aggiungere: 1, che la ripetizione della prova di omogeneità dopo l'esclusione di Barrea porta ad un valore di χ^2 di 1,371 (che per $n = 3$ dà P tra 0,80 e 0,70) assai dimostrativo della uniformità delle condizioni di parassitismo generale tra Civitellalfedena, Opi, Pescasseroli e Villetta-Barrea; 2, che il confronto tra la percentuale di infestazione di Barrea e quella complessiva degli altri quattro Comuni (83,17%) dimostra pure, con la piena significatività del valore del $t = 4{,}247$ ($P < 0{,}01$ per $n > 30$ e $t > 2{,}575$), l'effettiva differenza tra i due gruppi considerati.

Tabella 13.

Confronto tra le percentuali di diffusione del parassitismo in generale e di alcuni parassiti nella popolazione infantile dei cinque Comuni studiati: valori di t.

Confronto tra:	soggetti parassitati	*G. intestinalis*	*A. lumbricoides*	*T. trichiura*
Barrea: Civitellalfedena . . .	3,069	1,684	2,297 (1)	0,894
Barrea: Opi	1,706	0,774	1,409	1,023
Barrea: Pescasseroli	4,536	0,796	4,718	3,728
Barrea: Villetta-Barrea . . .	3,060	0,262	2,354 (2)	3,379
Civitellalfedena: Opi	0,342	0,224	0,050	0,467
Civitellalfedena: Pescasseroli . .	1,248	1,259	1,653	1,413
Civitellalfedena: Villetta-Barrea.	1,001	1,262	0,438	1,753
Opi: Pescasseroli	1,001	0,461	0,869	0,924
Opi: Villetta-Barrea	0,558	0,622	0,253	1,323
Pescasseroli: Villetta-Barrea . .	0,612	0,370	0,842	0,842

$P < 0{,}01$ per $n > 30$ e $t > 2{,}575$

(1) P è tra 0,05 e 0,02.
(2) P è tra 0,02 e 0,01.

Quanto alle D% che si rilevano nella incidenza di ciascun parassita nei vari Comuni, la ripetizione della prova di omogeneità caso per caso (Tabella 12) dimostra come in base ai dati in nostro possesso, si possa affermare l'effettiva diversa diffusione tra i vari centri solo di *A. lumbricoides* e di *T. trichiura*, mentre tutte le altre differenze osservate possono essere dovute alla casualità della distribuzione; i dati relativi sono raccolti in Tabella 13.

b. *Diffusione e distribuzione delle parassitosi intestinali nella popolazione adulta.*

Vengono compresi in questa parte i dati su tutti i soggetti di età oltre i 12 anni, anche se per parte di essi, e cioè almeno quelli sotto i 20 anni, non sia appropriato parlare di popolazione adulta; ciò agevola però la trattazione, e del resto nel corso di questa si vedrà come tra il gruppo di 13-20 anni e gli altri non esistano sostanziali differenze.

La diffusione del parassitismo intestinale nel complesso dei soggetti oltre i 12 anni di età, anche se nettamente inferiore a quella registrata nella popolazione infantile — il confronto tra i due gruppi dà $t = 2{,}724$ (P 0,01 per $n > 30$ e $t > 2{,}575$) — è tuttavia da considerare abbastanza elevata; sui 216 soggetti esaminati ne sono invero risultati parassitati 143, pari al 66,20%; più

frequente che non tra i soggetti di 1-12 anni è tra essi il monoparassitismo, presentato da 85 individui (59,44%); negli altri 58 (40,56%) sono stati riscontrati da 2 a 4 parassiti.

Le specie repertate assommano anche in questo gruppo a nove, ma non tutte sono le stesse identificate nella popolazione infantile: si hanno infatti ugualmente 6 Protozoi e 3 Elminti, ma tra i primi mancano *E. histolytica* e *C. mesnili*

TABELLA 14.

Diffusione percentuale del parassitismo intestinale nella popolazione adulta del Parco Nazionale d'Abruzzo.

	soggetti esaminati	soggetti parassitati	*Entamoeba coli*	*Endolimax nana*	*Jodamoeba bütschlii*	*Retortamonas intestinalis*	*Trichomonas intestinalis*	*Giardia intestinalis*	*Hymenolepis nana*	*Ascaris lumbricoides*	*Trichuris trichiura*
1. Popolazione totale esaminata											
a) dati globali .	216	66,20	21,30	1,39	10,19	0,46	0,46	8,80	0,46	16,67	43,98
b) per sesso											
maschi . .	70	67,14	24,29	1,43	8,57	—	—	11,43	1,43	8,57	42,86
femmine . .	146	65,75	19,86	1,37	10,96	0,68	0,68	7,53	—	20,55	44,52
c) per classi di età											
13-20 . .	48	77,08	18,75	2,83	16,67	—	—	14 58	—	22,92	58,33
21-30 . .	40	72,50	27,50	2,50	12,50	—	2,50	10,[illegible]0	—	17,50	45,00
31-40 . .	49	59,18	20,41	—	6,12	—	—	6,12	2,04	22,45	32,65
41-50 . .	53	64,15	16,98	—	3,77	—	—	7,55	—	9,43	47,17
51... . .	26	53,85	23,08	3,85	15,38	3,85	—	3,85	—	7,69	30,77
2. Popolazione totale dei cinque Comuni											
Barrea . . .	40	65.00	27,50	—	10,00	—	—	10,00	—	2.50	47,50
Civitellalfedena	18	77,78	27,78	—	11,11	—	—	11,11	5,56	11,11	27,78
Opi. . . .	6	50,00	—	—	16,67	—	—	16,67	—	—	50,00
Pescasseroli .	99	59,60	11,11	3,33	8,89	—	1,11	10,00	—	24, 4	8,38
Villetta-Barrea	53	77,36	35,85	—	13,21	1,89	—	5,66	—	16,98	56,60

avendosi in più *Retortamonas intestinalis* e *Trichomonas intestinalis*, mentre tra i secondi è assente *E. vermicularis* e presente *Hymenolepis nana*. Come fatto per la popolazione infantile, nella Tabella 14 sono riuniti tutti i dati analitici circa la frequenza del parassitismo in genere e di ciascuna specie in particolare nella popolazione totale, per sesso, per classi di età e per ciascun Comune.

L'esame di tali dati permette le seguenti considerazioni:

1) Anche nella popolazione adulta nessuna influenza appare essere esercitata dal sesso dei soggetti sulla diffusione del parassitismo in generale: nè differenze statisticamente significative si rilevano a livello di ciascun parassita salvo che per *A. lumbricoides* in cui dal confronto tra le percentuali si ricava $t = 2{,}533$, che per $n > 30$ dà P tra 0,02 e 0,01. Tale differenza però, a più approfondita indagine, non sembra neppure essa veramente legata al sesso: se si osserva infatti (Tabella 8) la distribuzione delle diverse età nei due sessi e lo si pone in relazione al fatto della diversa diffusione di *A. lumbricoides* nelle varie classi di età considerate, tale aberrante comportamento sembra piuttosto da riferire alla composizione della popolazione in esame: la maggiore diffusione dell'ascaridiosi nel sesso femminile sarebbe in altri termini solo apparente, e dipendente dal fatto della grande prevalenza di soggetti femminili sui maschili (99 contro 34) in quelle età sotto i 40 anni in cui l'ascaridiosi risulta assai più largamente diffusa.

2) Nonostante le sensibili differenze di percentuale che si osservano tra le varie classi di età non si può sostenere l'esistenza di una effettiva diversità tra esse nè quanto a diffusione del parassitismo in generale nè circa quella di ciascun parassita; le prove di omogeneità portano tutte a valori di χ^2 (Tabella 15) che depongono per la mancanza di differenze tra i gruppi in esame. L'e-

Tabella 15.

Prova della omogeneità tra le classi di età dei soggetti adulti nei riguardi del parassitismo in generale e di alcuni parassiti: valori di χ^2.

soggetti parassitati	*E. coli*	*J. bütschlii*	*G. intestinalis*	*A. lumbricoides*	*T. trichiura*
6,339	0,375	6,435	1,625	6,014	8,618

$P < 0{,}01$ per $n = 4$ e $\chi^2 > 13{,}277$

ventuale influenza dell'età è stata anche indagata dividendo i soggetti esaminati nei due gruppi: da 13 a 40 anni ed oltre questa età: dai dati relativi, raccolti nella Tabella 16, emerge che l'unica D% che abbia significatività statistica (P tra 0,02 e 0,01) è quella presentata da *A. lumbricoides*.

TABELLA 16.

Confronto tra soggetti di 13-40 ed oltre 40 anni nei riguardi del parassitismo in generale e di alcuni parassiti.

soggetti esaminati	soggetti parassitati	*E. coli*	*J. bütschlii*	*G. intestinalis*	*A. lumbricoides*	*T. trichiura*
137	69,34	22,63	11,68	10,22	21,17	45,26
79	60,76	18,09	7,59	6.33	8,86	41,77
D °/₀	8,58	3,64	4,09	3,89	12,31	3,49
t	1,268	0,641	1,010	1,305	2,549	0,499

$P < 0{,}01$ per $n > 30$ e $t > 2{,}575$

3) Nella popolazione adulta, in base alle risultanze della prova di omogeneità (Tabella 17), non compaiono differenze evidenziabili tra i vari Comuni esaminati nè per quanto si riferisce al parassitismo intestinale in generale, nè a livello dei singoli parassiti salvo che per *E. coli* e *A. lumbricoides*. Dal confronto tra le percentuali di diffusione Comune per Comune si ha poi (Tabella 18) che delle D% osservate risultano statisticamente significative: per *E. coli*, solo quelle tra Barrea e Pescasseroli e tra Pescasseroli e Villetta-Barrea; e per *A. lumbricoides* solo quelle tra Barrea e Pescasseroli e tra Barrea e Villetta-Barrea, ciò che d'altronde è in buon accordo con le risultanze avutesi per questo stesso parassita anche tra i soggetti di 1-12 anni.

TABELLA 17.

Prova della omogeneità tra i diversi Comuni nei riguardi del parassitismo in generale e di alcuni parassiti, per la popolazione adulta: valori di χ^2.

soggetti parassitati	*E. coli*	*J. bütschlii*	*G. intestinalis*	*A. lumbricoides*	*T. trichiura*
6,804	16,298	1,967	2,350	11,317 (1)	6,858

$P < 0{,}01$ per $n = 4$ e $\chi^2 > 13{,}277$

(1) P è tra 0,05 e 0,02

TABELLA 18.

Confronto tra le percentuali di diffusione di E. coli *e* A. lumbricoides *nella popolazione adulta dei Comuni studiati: valori di* t.

confronto tra:	*E. coli*	*A. lumbricoides*
Barrea : Civitellalfedena	0,022	1,101
Barrea : Pescasseroli	2,120 (1)	4,383
Barrea : Villetta-Barrea	0,865	2,536 (2)
Civitellalfedena : Pescasseroli	1,514	1,534
Civitellalfedena : Villetta-Barrea	0,649	0,651
Pescasseroli : Villetta-Barrea	3,389	1,082

$P < 0{,}01$ per $n > 30$ e $t > 2{,}575$

(1) P tra 0,05 e 0,02
(2) P tra 0,02 e 0,01

c. *Considerazioni sulla diffusione e distribuzione delle specie di parassiti repertate.*

Entamoeba coli: appare discretamente diffusa nella popolazione in generale, ed è il protozoo più frequente negli adulti. Piuttosto scarsa nei soggetti di 1-5 anni, si presenta con valori più o meno corrispondenti in tutte le successive età. Apparrebbe particolarmente diffusa, percentualmente, a Villetta-Barrea e relativamente poco invece a Pescasseroli; la sua assenza ad Opi è certamente da riferire al piccolo numero di soggetti esaminati in questa località. Curiosa appare la D% che si osserva tra i soggetti di 1-12 anni e quelli oltre questa età di Civitellalfedena: essa non è però statisticamente significativa, dal confronto ottenendosi $t = 1{,}887$ che per $n > 30$ dà P compreso tra 0,1 e 0,05.

Entamoeba histolytica: è stata repertata con certezza in un ragazzo di 11 anni a Villetta-Barrea; altri vari casi che erano risultati dubbi all'esame estemporaneo (in soluzione fisiologica, in Lugol, con i metodi di Köhn e di Bidegaray) sono infatti stati chiariti, in senso negativo, dopo l'esame di preparati permanenti all'ematossilina ferrica.

Endolimax nana: sembra piuttosto poco diffusa: è stata repertata una sola volta ad Opi in un bambino, e 7 volte a Pescasseroli, 4 in bambini e 3 in adulti.

Jodamoeba bütschlii: è risultata abbastanza frequente sia in bambini che in adulti; la D% che si nota tra i due gruppi non è statisticamente significa-

tiva ($t = 1{,}177$ che per $n > 30$ dà P tra 0,3 e 0,2). Come sopra si è visto è tuttavia effettivamente più rara nelle più giovani età infantili. Percentualmente sembrerebbe aver la sua maggiore diffusione a Villetta-Barrea.

Retortamonas intestinalis: è stata repertata una sola volta, in una donna di 63 anni, a Villetta-Barrea.

Chilomastix mesnili: è stata repertata una sola volta, in un bambino di 4 anni, a Pescasseroli. Il parassita era presente in forma massiva, ma nessun disturbo era accusato dal soggetto.

Trichomonas intestinalis: pure questa specie è stata repertata una sola volta, in una donna di 23 anni, a Pescasseroli.

Giardia intestinalis: questa specie è risultata la più diffusa tra i bambini, e con alta incidenza; la sua frequenza viene diminuendo con il progredire dell'età. Dal confronto tra le percentuali di diffusione dei bambini e degli adulti si ricava un valore di t, 6,079, che dimostra con la sua piena significatività ($P > 0{,}01$ per $n > 30$ e $t > 2{,}575$) come nei riguardi della diffusione di questo parassita bambini ed adulti appartengono ad universi differenti. Percentualmente, nel totale della popolazione esaminata, la massima frequenza si avrebbe a Civitellalfedena e la minima a Villetta-Barrea.

Hymenolepis nana: è stata repertata una sola volta in un uomo di 34 anni a Civitellalfedena.

Ascaris lumbricoides: presenta una diffusione abbastanza elevata nella popolazione totale esaminata; la sua frequenza è nettamente minore nelle più giovani età infantili, segna il suo massimo nei soggetti di 6-12 anni, si riduce notevolmente dopo i 40 anni. Analogamente a quanto verificato per *G. intestinalis*, il confronto tra le percentuali di diffusione nei bambini e negli adulti dà un valore di t, 5,752 ($P < 0{,}01$ per $n > 30$ e $t > 2{,}575$), pienamente dimostrativo del diverso comportamento dei due gruppi nei riguardi dell'ascaridiosi. Percentualmente la massima frequenza si verificherebbe a Pescasseroli, e la minima a Barrea.

Enterobius vermicularis: questo parassita, il reperto delle cui uova all'esame delle feci si può, come noto, definire puramente occasionale, è stato repertato due sole volte in bambini.

Trichuris trichiura: è questo l'elminto, ed insieme il parassita, più largamente diffuso sia nei bambini che negli adulti, in cui si presenta con percentuali di frequenza praticamente uguali. La sua diffusione nei bambini di 1-5 anni è tuttavia nettamente minore di quella di tutte le altre età. Per località, dai valori percentuali, la massima frequenza si verificherebbe a Villetta-Barrea, mentre la minima si avrebbe a Civitellalfedena.

d. *Associazioni parassitarie.*

Nel corso delle presenti ricerche sono stati rilevati nella popolazione totale esaminata 155 casi di associazione parassitaria, pari al 47,40% di tutte le infestazioni osservate; di essi 97 sono di pertinenza dei soggetti di 1-12 anni e gli altri 58 di quelli da 13 in su, pari rispettivamente al 52,72% ed al 40,56% delle infestazioni osservate. Il confronto tra queste due percentuali dimostra con il valore del $t = 2{,}207$, che per $n > 30$ dà P tra 0,05 e 0,02, che la differenza tra esse è statisticamente significativa e cioè che la frequenza delle associazioni è effettivamente maggiore nei soggetti di 1-12 anni. Il numero delle specie associate è andato da 2 a 5 nei bambini e da 2 a 4 negli adulti; quello dei diversi tipi di associazione rilevati è stato 27 tra i primi e di 22 tra i secondi, con un totale di 35 differenti.

Nella Tabella 19 sono indicate in sintesi la composizione, con semplice ripartizione in Protozoi ed Elminti, delle associazioni parassitarie rilevate, il numero dei tipi di associazione che ne sono derivati ed il numero dei casi che ne sono stati osservati, sia per i bambini che per gli adulti. Nella Tabella 20

TABELLA 19.

Composizione e frequenza delle associazioni parassitarie.

N° delle specie parassite	Protozoi	Elminti	N° dei tipi di associazione		No dei casi	
			soggetti di 1-12 anni	soggetti da 13 anni in su	soggetti di 1-12 anni	soggetti da 13 anni in su
5	3	2	2	—	2	—
4	3	1	1	1	1	1
	2	2	3	1	8	1
	1	3	1	—	1	—
3	3	—	1	1	1	1
	2	1	3	7	4	10
	1	2	3	3	16	8
2	2	—	3	2	3	5
	1	1	9	6	23	24
	—	2	1	1	28	8
		Totale . . .	27	22	97	58

TABELLA 20.

Tipi di associazioni parassitarie e loro frequenze.

Associazioni parassitarie	*E. coli*	*E. histolytica*	*E. nana*	*J. bütschlii*	*C. mesnili*	*T. intestinalis*	*G. intestinalis*	*H. nana*	*A. lumbricoides*	*E. vermicularis*	*T. trichiurs*	Numero dei casi: soggetti d 1-12 anni	Numero dei casi: soggetti da 13 anni in poi	Numero dei casi: popolaz. totale
5 specie : 1	+		+	+					+		+	1	—	1
2	+			+			+		+		+	1	—	1
4 specie : 1	+	+					+				+	1	—	1
2	+		+						+		+	1	—	1
3	+			+			+				+	—	1	1
4	+			+					+		+	3	1	4
5	+						+		+		+	4	—	4
6	+								+	+	+	1	—	1
3 specie : 1	+		+								+	—	1	1
2	+			+			+					1	1	2
3	+			+							+	2	3	5
4	+						+		+			1	1	2
5	+						+				+	1	2	3
6	+								+		+	6	5	11
7			+	+							+	—	1	1
8			+				+		+			—	1	1
9				+			+				+	—	1	1
10				+					+		+	2	2	4
11							+		+		+	8	1	9
2 specie : 1	+		+									1	—	1
2	+			+								—	4	4
3	+					+						—	1	1
4	+						+					1	—	1
5	+								+			2	—	2
6	+										+	3	13	16
7			+	+								1	—	1
8			+								+	1	—	1
9				+				+				—	1	1
10				+					+			3	1	4
11				+							+	2	3	5
12					+						+	1	—	1
13							+		+			12	2	14
14							+			+		1	—	1
15							+				+	8	4	12
16										+	+	28	8	36
35	63	1	8	35	1	1	53	1	95	2	120	97	58	155
°/₀ di frequenza su quella assoluta	77,78	100,00	100,00	89,74	100,00	100,00	58,24	100,00	72,52	100,00	61,54			

sono invece riportati in dettaglio i diversi tipi di associazione rilevati con l'indicazione della frequenza di ciascuno di essi sia nei bambini che negli adulti; in calce sono poi riportate le percentuali di frequenza di ciascun parassita in associazione (rapporto tra frequenza in associazione e frequenza assoluta) nei bambini, negli adulti e nella popolazione totale esaminata.

Tabella 21.

Distribuzione percentuale del poliparassitismo nelle varie classi di età (% sui parassitati).

N° delle specie parassite	1-3	4-6	7-9	10-12	1-5	6-12	13-20	21-30	31-40	41-50	51...
5	—	—	2,22	2,78	—	2,02	—	—	—	—	—
4	—	7,14	6,67	8,33	1,18	9,09	2,70	3,45	—	—	—
3	4,26	12,50	17,78	11,11	7,06	15,15	21,62	6,90	17,24	2,94	21,43
2	25,53	39,29	4,44	27,78	32,94	36,36	24,32	37,93	17,24	26,07	21,43
Totale . .	29,79	58,93	71,11	50,00	41,18	62,63	48,65	48,28	34,48	29,41	42,86

Si è già osservato come sulla frequenza delle associazioni parassitarie influisca l'età dei soggetti. In Tabella 21 sono raccolti i dati analitici sulla distribuzione percentuale del poliparassitismo nelle varie classi di età: da essi risalta con particolare evidenza sia il più basso valore presentato dalla classe 1-3 anni, sia il netto divario — statisticamente significativo, dal confronto avendosi $t = 2{,}999$ ($P < 0{,}01$ per $n > 30$ e $t > 2{,}575$) — tra i due gruppi di 1-5 e 6-12 anni. La massima frequenza del poliparassitismo si verifica in quella stessa classe di età 7-9 anni che è titolare della massima incidenza parassitaria.

Conclusioni.

Da quanto esposto in questa seconda parte del lavoro, si può concludere:

che la popolazione del Parco Nazionale d'Abruzzo presenta nel suo complesso un grado abbastanza elevato di diffusione delle parassitosi intestinali; il parassitismo stesso è però sostanzialmente sostenuto da un numero piuttosto scarso di specie: delle 12 complessivamente repertate ben 5 sono infatti state rinvenute in un solo soggetto ciascuna, ciò che può indurre a dubitare della loro autoctonia;

che la diffusione sia del parassitismo in generale che quella delle singole specie risulta indipendente dal sesso dei soggetti, mentre una decisa in-

fluenza su di essa viene esercitata dall'età degli stessi: i soggetti di 1-12 anni sono nel loro complesso più parassitati di quelli oltre tale età, ma tra essi quelli di 1-5 lo sono assai meno di quelli di 6-12;

che la frequenza del parassitismo non è uniforme nei vari Comuni studiati nè nella sua generalità nè nei confronti di alcuni singoli parassiti; tale conclusione basa però essenzialmente sulle risultanze dello studio della popolazione infantile, in quella adulta apparendo invero in proposito solo alcune differenze particolari;

che la frequenza del poliparassitismo è pure, nel suo complesso, abbastanza elevata e che su di essa influisce, in modo del tutto analogo a quello visto per il parassitismo in generale, l'età dei soggetti.

RINGRAZIAMENTI. — Per la collaborazione data nella raccolta dei soggetti su cui è stato effettuato il presente lavoro desidero ancora ringraziare i Dott. LEANDRO IANNUCCI, VINCENZO MASTRODICASA, ANTONIO TODINI e OLIVO PASTORELLI, rispettivamente Ufficiali Sanitari di Civitellalfedena, Opi, Pescasseroli e Villetta-Barrea, e OSCAR DI LORETO, farmacista di Barrea. Un particolare ringraziamento rivolgo anche al preparatore Sig. MARIO CARUGNO per il prezioso aiuto datomi nella esecuzione tecnica delle ricerche.

RIASSUNTO

Sono state prese in esame le seguenti località del Parco Nazionale d'Abruzzo: Barrea, Civitellalfedena, Opi, Pescasseroli, Villetta-Barrea, effettuando: ai soggetti di 1-12 anni un prelevamento con il nastro di cellofan adesivo (metodo di Graham) ed un esame delle feci; ai soggetti oltre i 12 anni, solo l'esame delle feci.

Nella ricerca sulla diffusione della ossiuriasi sono stati esaminati 653 soggetti. L'indice di infestazione è risultato del 32,47%; non sono state rilevate differenze della diffusione tra maschi (29,84 %) e femmine (34,91 %). Differenze sono state osservate invece in relazione all'età: in particolare i soggetti di 1-5 anni risultano nettamente meno infestati di quelli di 6-12 anni. La diffusione della ossiuriasi non è uniforme in tutti i centri studiati: Barrea e Villetta-Barrea presentano un grado di infestazione maggiore di quello delle altre tre località, che sono invece simili tra loro.

Nella ricerca sulla diffusione delle altre parassitosi intestinali sono stati esaminati 453 soggetti di età da oltre 1 a 74 anni. Nei 237 di età tra 1 e 12 anni, l'indice percentuale di infestazione è stato del 77,64 %; negli altri 216 oltre i 12 anni del 66,20 %. L'influenza dell'età sulla diffusione del parassitismo si manifesta in modo ancor più accentuato tra soggetti di 1-5 anni (68,00%) e di 6-12 anni (88,39%). I singoli parassiti presentano distribuzioni diverse in relazione all'età. Nessuna differenza sulla diffusione è esercitata dal sesso. La frequenza del parassitimo, e così quella di alcuni singoli parassiti, non è uniforme in tutti i centri studiati. L'analisi di tutti questi aspetti è stata comunque compiuta partitamente per i soggetti di 1-12 anni e per quelli oltre i 12 anni.

Sono state complessivamente identificate le seguenti 12 specie nelle percentuali a fianco indicate (la prima si riferisce ai soggetti di 1-12 anni e la seconda ai soggetti da 13 anni in poi): *Entamoeba coli* (14,77 %; 21,30 %), *Entamoeba histolytica* (0,42 %; —), *Endolimax nana* (2,11 %; 1,39 %), *Jodamoeba bütschlii* (7,17 %; 10,19 %), *Chilomastix mesnili* (0,42%; —), *Retortamonas intestinalis* (—; 0,46%), *Trichomonas*

intestinalis (—; 0,46 %), *Giardia intestinalis* (30,38 %; 8,80 %), *Hymenolepis nana* (—; 0,46 %), *Ascaris lumbricoides* (40,08 %; 16,67 %), *Enterobius vermicularis* (0,84 %; —), *Trichuris trichiura* (42,19 %; 43,98 %); cinque di esse, tutte rinvenute una sola volta, non sono probabilmente autoctone. Viene riferito in dettaglio sulla diffusione per età e per Comuni di ciascuno di questi parassiti.

Casi di poliparassitismo, con presenza da 2 a 5 specie, sono stati identificati nel 55,72 % dei soggetti parassitati di 1-12 anni, e, con presenza da 2 a 4 specie, nel 40,56 % di quelli da 13 anni in poi. Sono riportati in tabella i 35 tipi di associazione parassitaria complessivamente verificati ed i dati sulle loro relative frequenze nei due gruppi di età. Viene studiata la diffusione del poliparassitismo in relazione all'età.

SUMMARY

The present investigation has been carried out in the following localities of the National Park of Abruzzi: Barrea, Civitellalfedena, Opi, Pescasseroli, Villetta Barrea. Individuals from 1 to 12 years of age were screened with the « scotch cellophane tape » (Graham's method) and by an examination of faeces; individuals over 12 years of age were screened only by an examination of faeces.

To investigate the diffusion of enterobiasis, 653 individuals were examined. The infestation percentage proved to be 32,47%; no significant difference was found between males (29,84%) and females (34,91%). Differences were found, however, in connection with age: individuals from 1 to 5 years of age, were shown to be clearly less infested than those from 6 to 12 years. The diffusion of enterobiasis is not uniform in the various localities investigated: Barrea and Villetta Barrea showed an higher infestation percentage than that of the remaining localities, which present the same infestation rate.

For the investigation of the diffusion of the other intestinal parasitosis 453 individuals from 1 to 74 years of age were examined. In 237 individuals, whose age was from 1 to 12 years, the infestation percentage was shown to be 77,64%; in the remaining 216 individuals over 12 years of age it was 66,20% The influence of age on diffusion of parasitism is still more emphasized between individuals from 1 to 5 years (68,00%) and from 6 to 12 years of age (88,39%). No influence on diffusion is caused by sex. The frequency of the parasitism, or of single parasites, is not uniform in the various localities which were investigated. The analysis of these various aspects of the intestinal parasitism was carried out separately for individuals from 1 to 12 years and for those over 12 years of age. The following 12 species of parasites were identified in the percentages which are given as follows (the first percentage refers to individuals from 1 to 12 years, the second one to individuals over 12 years of age):

Entamoeba coli (14,77%; 21,30%), *Entamoeba histolytica* (0,42%; —), *Endolimax nana* (2,11%; 1,39%), *Jodamoeba bütschlii* (7,17%; 10,19%), *Chilomastix mesnili* (0,42%; —), *Retortamonas incstinalis* (—; 0,46%), *Trichomonas intestinalis* (—; 0,46), *Giardia intestinalis* (30,38%; 8,80%), *Hymenolepis nana* (—; 0,46), *Ascaris lumbricoides* (40,08%; 16,67%), *Enterobius vermicularis* (0,84%; —); *Trichuris trichiura* (42,19%; 43,98%).

Five among these, all of which were found once only, are probably not autochthonous. Details are given on the diffusion of every parasite in the various ages groups and localities.

Polyparasitism was found in a percentage of 52,72% of the parasitized individuals from 1 to 12 years of age, and in 40,56% of those over 12 years of age. The number of species which were present varied from 2 to 4 in the individuals from 1 to 12 years, and from 2 to 5 in the individuals over 12 years of age. A table shows the 35 parasite association types which were found and their relative frequencies in the two groups of ages. The diffusion of polyparasitism is discussed in connection with age.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 2 Aprile 1958

ALTERAZIONI DEL FEGATO NELLA SCHISTOSOMIASI DEI BOVINI SOMALI

RENZO SOBRERO (*)

La sede di elezione di *Schistosoma bovis* (Sonsino, 1876) è rappresentata di norma dal sistema venoso mesenteriale ed occasionalmente, specie nei casi di infestazioni massive, da altri distretti del sistema della vena porta (epatico, pancreatico, splenico, etc.) (Leinati (1), Monari - Montrone - Mercato (2), Brumpt (3), Neveu - Lemaire (4), Alessandrini (5), Bertolini (6)).

Le conseguenti alterazioni anatomiche macro-microscopiche del tubo digerente e delle ghiandole annesse (fegato, pancreas) sono state particolarmente descritte ed illustrate da Carta (7) e Costa (8) nei bovini della Sardegna.

Secondo nostre osservazioni, la presenza di *S. bovis* e delle sue uova nelle vene epatiche del bovino somalo può causare processi patologici caratteristici, che costituiscono interessanti reperti autoptici e che riteniamo opportuno segnalare come « sclerosi epatica nodulare » e « sclerosi epatica nodosa », a volte associate.

Sclerosi epatica nodulare

All'esame microscopico, la superficie del fegato interessata è irregolare. cosparsa di piccole granulosità, con parti infossate ed altre sporgenti: le zone avvallate sono in rapporto a parenchima illeso, mentre le zone sporgenti sono costituite da esili tralci o noduli connettivali. La lesione può essere diffusa o localizzata.

Il volume della parte colpita è lievemente aumentato, i margini sono duri, il colorito grigio giallastro, la consistenza è notevole e si incontra difficoltà al taglio.

La superficie di sezione del fegato permette di rilevare la presenza di piccole isole, di uno o due mm. di diametro, biancastre, rotonde od arborizzate,

(*) *Istituto Sierovaccinogeno, Merca (Somalia).*

compatte (noduli in sezione), che costellano il parenchima epatico e conferiscono l'aspetto granuloso alla superficie esterna dell'organo.

All'esame microscopico, le strutture lobulari appaiono in gran parte conservate: solo in corrispondenza del tessuto di neoformazione connettivale, che contiene uova di *S. bovis* in numero vario e di forma diversa a seconda dell'incidenza della sezione, la distruzione e la sostituzione delle primitive strutture sono evidenti (fig. 1 - 2).

I noduli parassitari, isolati od avvicinati uno all'altro, sono composti da fasci collageni, che circoscrivono uova embolizzate nelle piccole diramazioni portali ed obliterano totalmente il lume di queste (fig. 3).

Il connettivo di neoformazione appare infiltrato da cellule plasmatiche, linfocitosimili e granulociti eosinofili.

E' possibile inoltre osservare uova di schistosoma libere nei lobuli epatici.

Sclerosi epatica nodosa

E' causata dal trematode adulto.

Macroscopicamente, la superficie del fegato si presenta liscia, normale: solo nei casi di associazione colla epatite da uova sopradescritta l'organo presenta anche il carattere granuloso di questa.

Formazioni rotonde, dure al tatto, dalle dimensioni di un cece a quelle di una nocciola e più, disposte in genere verso il margine inferiore del fegato, sporgono leggermente a guisa di cupola sulla superficie o si trovano completamente nell'interno dell'organo.

Alla sezione dell'organo è possibile osservare parassiti, identificati all'esame microscopico quali *S. bovis* maschi e femmine, i quali fuoriescono dai vasi commisti a sangue od inclusi in coaguli sanguigni.

Le formazioni sopradette corrispondono sia a trombi emorragici includenti parassiti, sia a nodi connettivali espressione della organizzazione dei trombi.

Questi trombi occludono totalmente i segmenti parassitati delle diramazioni portali di maggior calibro, i quali risultano dilatati eccessivamente, a tal punto da apparire come cavità rotonde a sè stanti: alla flebectasia ed alla trombosi obliterante segue la sclerosi dall'aspetto nodoso.

Le formazioni nodose organizzate sono perfettamente lisce, composte da una serie di capsule concentriche, e sono facilmente enucleabili dalla cavità del tratto venoso ectasico, colla parete del quale rimangono in connessione per mezzo di una o più aderenze (fig. 4).

L'aspetto caratteristico di tali forme nodose è rivelato, al taglio delle stesse, da una serie di strati connettivali concentrici, corrispondenti alle capsule sezionate, e disposti intorno ad un nucleo o massa connettivale compatta, rotondeggiante ed eccentrica (aspetto della «cipolla» tagliata a metà (fig. 5).

Le cavità ectasiche possono a volte essere vicine, con le pareti a contatto,

e costituire un insieme di celle a contenuto vario, dai trombi emorragici contenenti i parassiti alle caratteristiche formazioni a capsule con disposizione concentrica (fig. 6).

All'esame microscopico, nei vasi sanguigni di vario calibro si osservano schistosomi in diverse sezioni (fig. 7): nelle pareti ectasiche il connettivo sotto-endoteliale si presenta in proliferazione e la tunica media è scarsa di fibro-cellule muscolari dissociate e soppiantate da tessuto connettivo, sclerotico.

In alcune cavità dilatate si nota la disposizione a strati concentrici del trombo e la presenza di parassiti; in altre, l'inizio dell'organizzazione del trombo, nel quale è ancora possibile vedere lo schistosoma o qualche residuo di esso (fig. 8); in altre infine, la completa formazione delle capsule connettivali e la scleria completa della parete vasale: costante è l'infiltrazione parvi-cellulare.

Di particolare interesse è il rilievo di due o più formazioni confluenti, per effrazione della parete vasale (fig. 9), a costituire masse sclero-tromboemorragiche anche di considerevoli dimensioni.

***

La sclerosi epatica nodulare e la sclerosi epatica nodosa, da noi descritte come il risultato della infestazione del fegato del bovino somalo da parte di *S. bovis* e delle sue uova, permettono di esporre alcune conclusioni.

La sclerosi epatica nodulare, originata dalla reazione del tessuto epatico e caratterizzata da formazioni nodulari migliariformi intorno alle uova di *S. bovis* embolizzate nelle piccole diramazioni portali, presenta punti di contatto con i processi cirrotici intorno agli stessi vasi, causati da uova di altri schistosomi, quali *S. mansoni* e *S. japonicum* nell'uomo e con la alterazione epatica da uova dello stesso *S. bovis* descritta da Carta (9), negli ovini.

Latulle (3) riferisce che nella infestazione del fegato da uova di *S. mansoni* si può osservare una «cirrosi ad isole», per significare la costellazione di tutto il parenchima epatico di noduli parassitari: a nostro avviso, questa definizione rispecchia anche i caratteri morfologici della sclerosi da uova di *S. bovis* nel bovino somalo.

Le uova libere nei lobuli epatici inducono ad associarci alla tesi di Carta (9), basata su acute osservazioni ed illustrazioni, circa la possibilità per le stesse di raggiungere la vena centrolobulare e di superare il filtro epatico, tesi avvalorata successivamente da Deiana (10) con la descrizione della localizzazione polmonare dello *S. bovis* e delle sue uova, che avevano superato in precedenza la barriera epatica del bovino intaccandola.

La sclerosi epatica nodosa, causata dal parassita adulto ed originata dalla progressiva organizzazione del trombo emorragico disposto a strati concentrici intorno al parassita, è un aspetto del processo di reazione della ghiandola alla penetrazione ed al passaggio dello schistosoma.

I diversi stadi evolutivi della alterazione anatomica (flebectasia, trombosi obliterante, sclerosi) nello stesso fegato indicano invasioni successive del sistema portale della ghiandola da parte del parassita.

La inconfondibile formazione a capsule concentriche od « a cipolla » permette di stabilire che il fegato ha subito tale alterazione ad opera unicamente di *S. bovis*, anche a distanza di tempo dell'avvenuta infestazione ed in occasionale assenza del parassita nei vasi epatici: di conseguenza essa assume carattere di specificità della schistosomiasi epatica del bovino somalo.

RIASSUNTO

L'autore descrive le alterazioni anatomiche macro e microscopiche del fegato nella schistosomiasi del bovino somalo.

La sclerosi epatica nodulare, causata da uova di *S. bovis*, ha caratteri morfologici simili a quelli delle cirrosi da uova di altri schistosomi quali, ad esempio in medicina umana, *S. mansoni* e *S. japonicum*.

La sclerosi epatica nodosa, descritta per la prima volta, è conseguente all'azione del parassita stesso ed ha caratteri tipici inconfondibili, i quali permettono di considerarla come lesione specifica della schistosomiasi epatica del bovino somalo.

SUMMARY

Macroscopic and microscopic anatomical alterations in the liver of the somali ox due to schistosomiasis are described.

The morphological characters of « nodular » hepatic sclerosis caused by *S. bovis* eggs are similar to those of cirrhosis due to eggs of other schistosomes, as e. g. by *S. mansoni* and *S. japonicum* in man.

The « knotted » hepatic sclerosis, described here for the first time, is caused by adult worms; its typical characters are unmistakable, and permit to consider it as a specific lesion of hepatic schistosomiasis of the somali ox.

BIBLIOGRAFIA

1) Leinati L. (1955): *Compendio di anatomia patologica degli animali domestici*, 3a Ed. CEA, Milano.

2) Monari D., Montroni L. e Mercato A. (1949): *Anatomia patologica degli animali domestici*, C. E. Patron, Bologna.

3) Brumpt E. (1940): *Precis de Parasitologie*. Masson et C.ie editeurs, Paris.

5) Alessandrini G. (1929): *Parassitologia dell'uomo e degli animali domestici*. UTET, Torino.

6) Bertolini G. (1908): *La Clinica Veterinaria*, *31*, 1.

7) Carta A. (1951): *Rivista di Parassitologia*, *XII*, 169-183.

8) Costa A. (1949): *Profilassi - XXII*.

9) Carta A. (1947): *Profilassi - XX*, 181-190

10) Deiana S. (1953): *Rivista di Parassitologia - XIV*, 181-190.

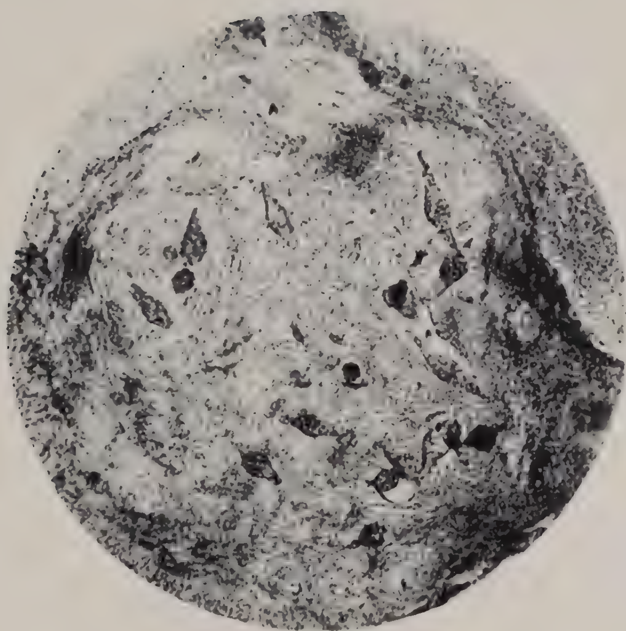


Fig. 1 — Nodulo connettivale contenente uova di *S. bovis.*

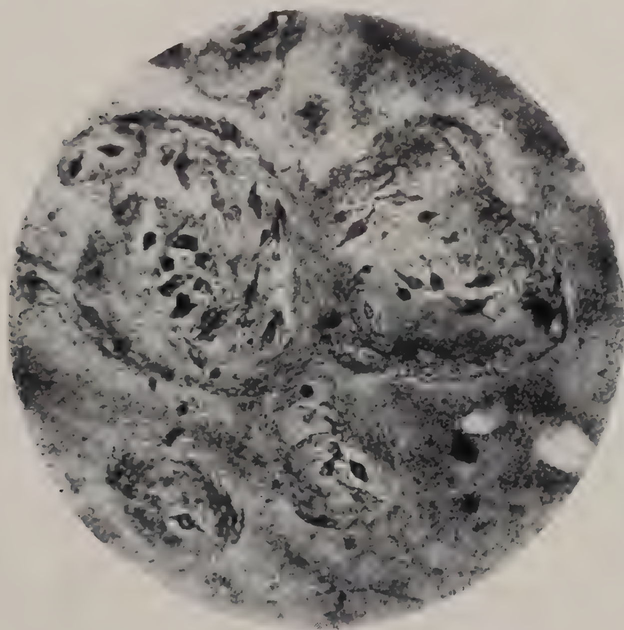


Fig. 2 — Gruppo di noduli connettivali contenenti uova di *S. bovis.*

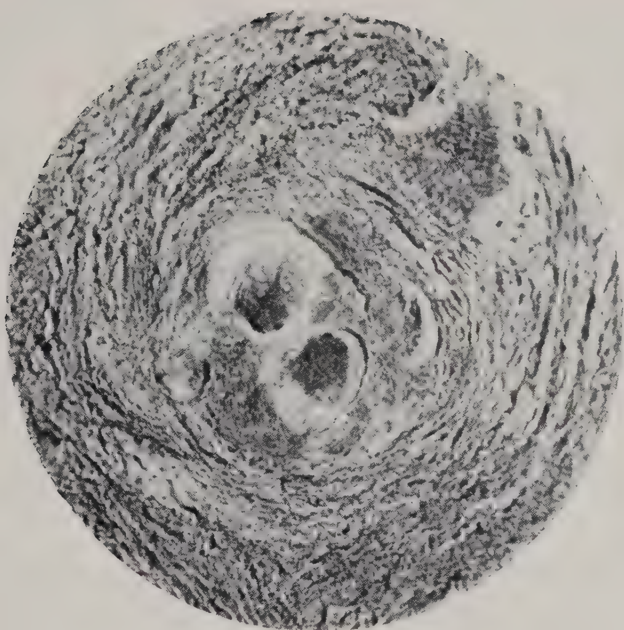


Fig. 3 — Fasci collageni che circoscrivono uova di *S. bovis* embolizzate nelle piccole diramazioni portali.



Fig. 4 — Caratteristica formazione nodosa.

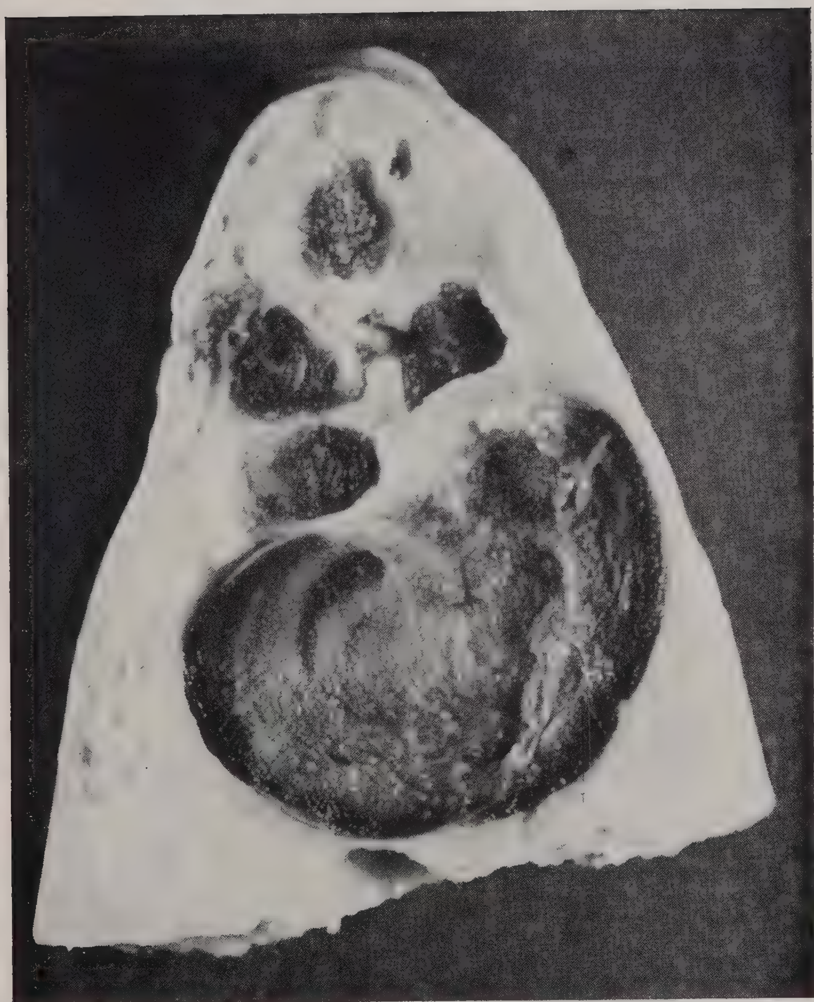


Fig. 5 — Aspetto della superficie di sezione
di una caratteristica formazione nodosa.

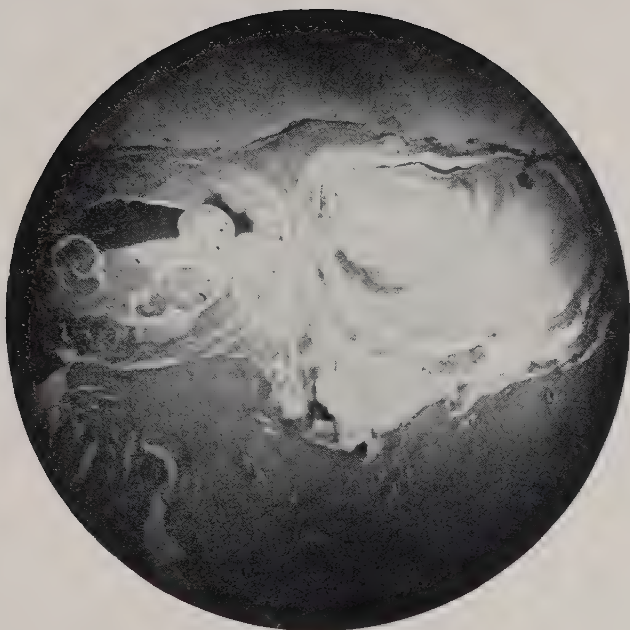


Fig. 6 — Particolare di due cavità venose ectasiche.

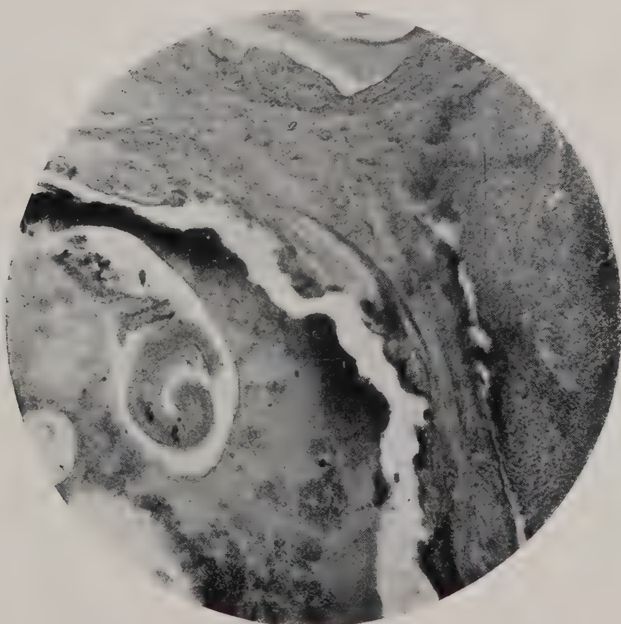


Fig. 7 — *S. bovis* in vasi epatici (*particolare*).

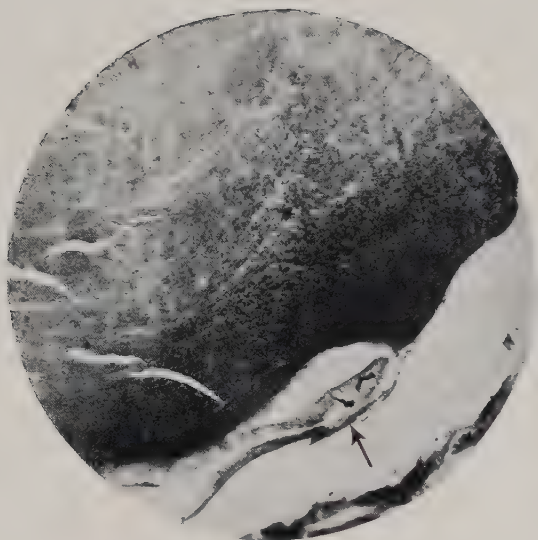


Fig. 8 — Inizio della organizzazione del trombo disposto a strati concentrici e residuo di parassita (indicato dalla freccia). (*particolare*).

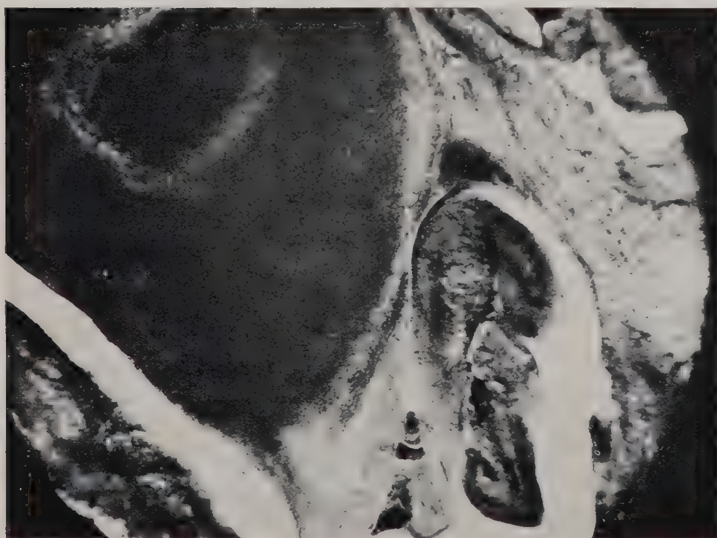


Fig. 9 — Effrazione delle pareti di due cavità venose ectasiche vicine e schistosomi a contatto diretto con una formazione nodosa in via di completa organizzazione (*particolare*).

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 2 Aprile 1958

SULLA VALIDITA' DI TRE SPECIE DEL SOTTOGENERE BERLESIANO *MACROCHELES* (*ACARINA, MESOSTIGMATA*). (*)

ALESSANDRO FILIPPONI e ANTONIETTA ILARDI (**)

Introduzione

E' generalmente nota la presenza, nel letame, dei più grossi Macrochelidi che si conoscano. La prima segnalazione, invero piuttosto vaga, risale a Goeze (1776); ma altri autori si occuparono, in seguito, dei medesimi acari, accumulando, peraltro, notizie non sempre concordi che lasciano tuttora aperti problemi fondamentali, circa la loro stessa sistematica.

Non è chiaro, infatti, anzitutto, se i Macrochelidi giganti siano da riferirsi a più specie (Berlese, 1889, e 1918; Foà 1900; Hull 1918 e 1925), o ad un'unica specie (Oudemans 1929 e 1936, Sellinck 1931 e 1940; Evans e Browning 1956).

Berlese (1918) istituì, per essi, il sottogenere *Macrocheles*, ritenendo di individuare, nelle quattro specie da lui citate, caratteri comuni che le differenziassero da altre specie di Macrochelidi fimicoli, da lui riunite nel sottogenere *Coprholaspis;* ma tale opportunità fu ignorata, o posta in dubbio, o rigettata senz'altro da tutti gli autori successivi (Oudemans 1929 e 1936; Sellnick 1931 e 1940; Pereira e De Castro 1945; Evans e Browning 1956).

Data e non concessa la pluralità di specie, resta da stabilire se tali specie siano tutte ed esclusivamente fimicole, o non si verifichino, invece, altre alternative.

Vengono, da ultimo, le questioni sinonimiche che hanno maggiormente interessato gli autori. Su alcune di queste non c'è più da discutere, essendo definitivamente risolte. Così, ad esempio, *Holostaspis marginatus* Berl., 1889, non si identifica con *Acarus marginatus* Hermann, 1804, per cui la specie berlesiana deve avere altra denominazione (Oudemans 1929; Sellnick 1931 e 1940; Evans e

(*) Il lavoro è stato eseguito presso il Centro di Studi per la Lotta contro gli Insetti Nocivi.

(**) *Istituto Superiore di Sanità. Laboratorio di Parassitologia. Roma.*

BROWNING 1956); il sottogenere *Coprholaspis* Berlese, 1918 è basato sulla stessa specie tipo del genere *Macrocheles* Latr., per cui *Coprholaspis* cade in sinonimia con *Macrocheles*, e al sottogenere *Macrocheles* Berl., 1918 sarebbe, in ogni caso, necessario attribuire un nuovo nome (PEREIRA e DE CASTRO 1945). Su altre questioni, invece, a nostro parere, è del tutto inutile discutere, finchè almeno non si sia appurata l'obbiettività dei fatti, relativi ai problemi sopra esposti.

Questa nota vuol rappresentare, appunto, un primo concreto contributo alla soluzione di tali problemi e si propone di controllare, su basi sperimentali, le asserzioni di FOÀ (1900), integralmente accettate da BERLESE (1918) e completamente ignorate da tutti gli autori successivi.

Per FOÀ (1900): 1) i grossi Macrochelidi appartengono a tre differenti specie: *Holostaspis marginatus* Berl., 1889, *Holostaspis vagabundus* Berl., 1889, *Holostaspis confusus* Foà, 1900; 2) tutte e tre le specie sono fimicole e si rinvengono commiste; 3) le differenze morfologiche, accentuatissime nei maschi, sarebbero pressochè nulle nelle femmine: più precisamente, le femmine di *marginatus e vagabundus* sarebbero del tutto indistinguibili, mentre le une e le altre si differenzierebbero dalle femmine di *confusus* per un unico carattere, la forma dell'epistoma.

La FOÀ non lasciò tipici, ma aveva effettuato le proprie osservazioni nell'Agro Romano. Se le tre specie esistevano realmente, avremmo dovuto rintracciarne i topotipi. Inoltre, essendo già riuscito ad uno di noi (FILIPPONI 1955) l'allevamento di una delle tre specie, diveniva realizzabile associare all'osservazione ecologica in natura, il controllo sperimentale in laboratorio.

OSSERVAZIONI ECOLOGICHE NELL'AGRO PONTINO

La FOÀ (1900) parla genericamente di letame. Noi abbiamo preso in considerazione tre distinti «coprotopi»: 1) le concimaie (manure in brick-lined pits), 2) i mucchi di letame sul terreno (manure pile and stark on the ground surface), 3) lo sterco animale, naturalmente sparso nei campi, o accumulato in sottile strato in ricoveri di varia natura (animal droppings and dung). Le condizioni ecologiche di questi biotopi non sono identiche per lo stesso tipo di sterco, variando inoltre, per ogni coprotopo, a seconda della natura e composizione del letame.

La campionatura comprende due fasi. Nella prima, esclusivamente orientativa, si andò alla ricerca delle tre «forme», che, in questo lavoro, continueremo ad indicare, a puro titolo di riferimento, come *confusus, marginatus, vagabundus*. Nella seconda, tuttora in corso di espletamento, si raccolsero dati quantitativi, nell'intento di precisare la distribuzione ed abbondanza delle tre forme nei varii coprotopi.

Esistendo solo per i maschi descrizioni adeguate, la prima fase della campionatura fu basata esclusivamente sul controllo di questo sesso. Da numerose località dei dintorni di Roma si prelevarono campioni di sterco che venivano

filtrati in imbuti Berlese, particolarmente modificati, in modo da permettere la raccolta di materiale vivo. Le grosse femmine di Macrochelidi, eventualmente rinvenute, venivano poste singolarmente in vasetti da allevamento, con sterco e uova di mosche, e la loro progenie veniva successivamente esaminata per il controllo dei maschi.

Per molto tempo vedemmo solo maschi *confusus*. Il tipo di distribuzione dei tubercoli nelle zampe ripeteva, con estrema costanza, quello disegnato dalla Foà (1900). Tenuto conto della eterogeneità ed abbondanza del materiale esaminato, appariva scarsamente probabile che i maschi di *marginatus* e *vagabundus*, disegnati da Berlese (1889), potessero rappresentare casi estremi di variabilità di un medesimo tipo morfologico. Finalmente, da femmine, filtrate da droppings di asino, raccolti nella piana di Fondi, si ottennero i primi maschi *vagabundus*. I maschi *marginatus* si ebbero successivamente da femmine raccolte in una concimaia di bovina, in località Campo Morto (Latina).

Con il materiale rinvenuto si istituirono tre ceppi di laboratorio. I caratteri distintivi dei tre tipi di maschi si trasmettevano, inalterati, nelle successive generazioni. Ad un esame più accurato potemmo inoltre constatare che le femmine dei tre ceppi si differenziavano tra loro, possedendo ciascuna delle tre forme una propria chetotassi. Le differenze, sebbene meno appariscenti di quelle che distinguono i maschi, erano comunque tali, da rendere possibile, anche *in vivo*, una sicura identificazione delle femmine appartenenti alle tre forme.

Quest'ultimo reperto rese possibile l'inizio della seconda fase del campionamento. Il singolo campione è rappresentato da un secchio della capacità di 14 litri. I droppings si raccoglievano a caso nel campo fino a riempire il secchio; per i mucchi o le concimaie si prelevava, con la forcina, da una determinata ristretta zona del cumulo, tanto sterco fino a colmare il secchio. Dopo la filtrata si effettuava il censo totale dei soli adulti, femmine e maschi. La identificazione si faceva *in vivo*, immergendo gli esemplari in un velo d'acqua, per tenerli fermi e nettarli, ed osservando, al binoculare stereoscopico, nelle femmine la chetotassi e nei maschi la distribuzione di speroni e tubercoli nelle zampe.

Nella tabella 1 sono riportati i dati globali relativi a 20 di tali campionamenti, scelti a rappresentare località diverse e differenti coprotopi, ed effettuati nelle varie stagioni. Su 20 campioni i grossi Macrochelidi sono presenti ben 19 volte con 1529 esemplari e cioè, in media, 76,45 per secchio. Delle tre forme il *confusus* è presente 16 volte, il *marginatus* 13, il *vagabundus* 7. Il 66,45% degli individui è rappresentato dal *confusus*, il 29,04% dal *marginatus*, il 4,51% dal *vagabundus*. In tre casi si è trovata l'associazione delle tre forme, in otto casi l'associazione *confusus-marginatus*, in tre casi, infine, l'associazione *confusus-vagabundus*.

Da questo primo gruppo di osservazione ed esperienze scaturivano, dunque, le seguenti constatazioni: 1) Nei dintorni di Roma, esistevano realmente tre « forme » diverse di grossi Macrochelidi i cui maschi corrispondevano, con

TABELLA 1.

Censo totale degli adulti di confusus, marginatus, vagabundus, *rivenuti in 20 campioni di sterco prelevati nell'Agro Pontino e nell'Agro Romano.*

Località	Data	Coprotopo	Totale	*confusus*	*marginatus*	*vagabundus*
Foglino . . .	7.2	cavallina, droppings	—	—	—	—
Carano . . .	10.2	pecorina, droppings	73	44	29	—
Podere 135 . .	7.3	cavallina, concimaia	150	104	46	—
Portonaccio . .	14.3	cavallina, cumulo	89	86	—	3
Campo Morto. .	24.3	bovina, cumulo	28	27	1	—
Norma . . .	26.7	pollina, droppings	10	10	—	—
Selva Vetere . .	29.7	bovina, cumulo	3	—	3	—
Campo Morto. .	5.8	bovina, cumulo	20	13	7	—
Campo Morto. .	5.8	bovina, concimaia	8	7	1	—
Portonaccio . .	10.8	cavallina, cumulo	10	4	—	6
Podere 129 . .	12.8	cavallina, concimaia	14	10	—	4
Campo Morto. .	10.11	cavallina, droppings	1	—	—	1
Norma . . .	22.11	pollina, droppings	1	1	—	—
Selva Vetere . .	25.11	pollina, droppings	6	—	6	—
Campo Morto. .	6.12	bovina, concimaia	401	387	14	—
Padiglione. . .	10.1	cavallina, droppings	5	1	3	1
Sermoneta . . .	13.1	pecorina, droppings	15	8	7	—
Podere 135 . .	24.1	cavallina, concimaia	465	271	147	47
Podere 126 . .	24.1	bovina, concimaia	189	15	167	7
Podere 126 . .	24.1	pollina, droppings	41	28	13	—

esattezza, a quelli descritti, rispettivamente, da BERLESE (1889) per *H. marginatus* e *H. vagabundus* e da FOÀ (1900) per *H. confusus*. 2) Le tre forme, complessivamente considerate, entravano, come componenti normali, nell'acarofauna dei coprotopi esaminati. La forma più diffusa e più abbondante appariva il *confusus;* meno diffuso e meno abbondante il *marginatus,* raro e scarso il *vagabundus*. 3) Contrariamente a quanto ritennero FOÀ (1900) e BERLESE (1918), esistevano evidenti caratteri differenziali anche a carico delle femmine. 4) I caratteri differenziali dei maschi e delle femmine venivano trasmessi inalterati nelle successive generazioni; e da una stessa madre non si ottenevano che figli dello stesso tipo.

Queste risultanze erano ovviamente a favore del valore specifico delle tre forme, rappresentando qualcosa di più che semplici indizi. Tuttavia, essendo

riusciti ad allevare tutte e tre le « forme », valeva la pena tentare la prova dell'isolamento riproduttivo, per stabilire definitivamente se dovevano considerarsi, a tutti gli effetti, tre *bonae species*.

Prove di isolamento sessuale

Da uno studio precedente (Filipponi 1955), condotto su una delle tre forme, *confusus*, indicata allora come *Nothrholaspis fimicola*, era risultato trattarsi di una specie arrenotoca. Per quanto era lecito desumere dagli allevamenti preliminari, sopra utilizzati, sembrava che anche le altre due lo fossero.

Le prove di isolamento sessuale in specie arrenotoche presentano aspetti particolari che sono già stati analizzati in altro lavoro (Filipponi e Cervone 1957). Una soluzione soddisfacente, nel caso dei Macrochelidi, consiste nell'istituire incroci interspecifici ed intraspecifici con materiale il più possibilmente omogeneo, sottoponendo le femmine utilizzate ad eguale probabilità di inseminazione, in identiche condizioni sperimentali, e confrontando poi statisticamente il numero di femmine comparse nei due gruppi di progenie.

Il piano degli esperimenti d'incrocio appare nella prima colonna della tabella 2. I primi tre sono gli incroci intraspecifici e costituiscono i controlli. Seguono da 4 a 9 i sei incroci interspecifici, secondo tutte le combinazioni possibili tra le tre specie. Per ogni tipo d'incrocio sono state fatte 7 replicazioni. Tutti gli esperimenti furono condotti contemporaneamente.

Tabella 2.

Risultati ottenuti dagli incroci intraspecifici ed interspecifici di confusus (c), marginatus (m), vagabundus (v).

N° d'ord.	Tipo d'incrocio	N. femmine utilizzate	N. femmine sufficientemente feconde	N. femmine inseminate	Totale figli nelle progenie	Totale femmine nelle progenie
1	♀ c × ♂ c	7	7	7	415	301
2	♀ m × ♂ m	7	6	6	54	18
3	♀ v × ♂ v	7	5	4	139	25
4	♀ c × ♂ m	7	7	0	309	0
5	♀ m × ♂ c	7	6	0	91	0
6	♀ c × ♂ v	7	7	0	523	0
7	♀ v × ♂ c	7	5	0	101	0
8	♀ m × ♂ v	7	4	0	105	0
9	♀ v × ♂ m	7	6	0	68	0

Per avere materiale omogeneo e sicuramente vergine si è così proceduto. Con una cinquantina di femmine di ciascuna forma, prelevate dagli allevamenti di massa, mantenuti in laboratorio e riforniti, di continuo, con materiale raccolto in natura, si istituirono degli allevamenti di massa ausiliari dai quali, dopo 10 giorni, si raccolsero le deutoninfe dei due sessi, prossime alla muta, per allevarle singolarmente in tubetti. Tra le femmine appena mutate, per ognuna delle tre forme, si scelsero a caso tre gruppi di 7 femmine per gli incroci intra ed interspecifici. Per i maschi si scelsero, parimenti a caso, individui vergini al 2° - 4° giorno dopo la muta. Le femmine furono segregate ciascuna con due maschi per le prime 48 ore e con un solo maschio, diverso dai primi due, per i successivi due giorni, dopo di che non videro più maschi fino alla morte.

Per lo studio della progenie si è seguita la metodica già adottata (FILIPPONI 1955; FILIPPONI e CERVONE 1957; FILIPPONI e SEGANTI 1957) con altri Macrochelidi. Le femmine in esperimento erano allevate in vasetti da 150 cc. contenenti un cilindro di carta bibula del diametro di 2 cm e dell'altezza di 6 cm, in cui si ponevano circa 10 cc. di sterco di cavallo ed alcune centinaia di uova di mosche. Il vaso era coperto con un panno di tela. Ogni 48 ore le madri venivano trasferite in una nuova serie di vasetti. I vasetti della serie precedente, riforniti di altro sterco e di altre uova di mosca, venivano riposti in termostato, per lo sviluppo delle uova deposte nelle 48 ore. Dopo 7 giorni si faceva la conta delle femmine e dei maschi, nati in ogni intervallo di deposizione. Sia i vasetti contenenti le madri, che quelli per lo sviluppo dei figli, erano tenuti in termostato a 27°-28° e 90-100% U. R.

I risultati degli esperimenti d'incrocio sono sintetizzati nella tabella 2. Nella prima colonna è il numero d'ordine dell'incrocio; nella seconda è indicato il tipo d'incrocio; nella terza il numero delle femmine utilizzate, e cioè, le replicazioni per ogni tipo d'incrocio; nella quarta il numero delle femmine che diedero prole, almeno oltre il secondo intervallo di deposizione; nella quinta il numero delle madri con prole femminile; nella sesta il totale dei figli, ottenut da tutte le progenie di ciascun tipo d'incrocio; nella settima il numero di femmine in dette progenie.

Come era d'attendersi da specie arrenotoche, in tutti gli incroci si sono ottenuti figli; ma, mentre dagli incroci intraspecifici si ebbero sia femmine che maschi, le progenie dei sei incroci interspecifici sono rappresentate da soli maschi. Questo conferma anzitutto che non solo *confusus*, per cui era già stato provato, ma anche le altre due forme sono realmente arrenotoche. In caso di arrenotochia, normalmente, la comparsa di una femmina, nella progenie, è conseguenza di una fecondazione sicuramente avvenuta. Ora la presenza di femmine in ciascuna dei 3 incroci intraspecifici, anzi, nella quasi totalità delle singole replicazioni sta a dimostrare che, sia il materiale utilizzato, che la metodica impiegata, rendevano effettuabile l'inseminazione e la fecondazione. Se, dunque, in nessuna delle 42 progenie dei sei incroci interspecifici compaiono femmine, ciò può essere attribuito esclusivamente all'esistenza, tra le forme, di un isolamento sessuale completo.

FOÀ (1900) e BERLESE (1918) avevano dunque ragione: *H. marginatus*, *H. vagabundus*, *H. confusus*, qualunque siano i nomi definitivi che dovranno loro attribuirsi, rappresentano, senza alcuna limitazione, tre distinte specie.

TABELLA 3.

Longevità in giorni delle femmine adulte di confusus, marginatus, vagabundus *e relativa analisi della devianza.*

Specie	Media	Deviazione standard	Coefficiente di variabilità
confusus	41,90	14,43	34,44
marginatus	25,81	18,49	71,64
vagabundus.	46,29	16,81	36,31

Analisi della devianza per le tre specie.

Origine variazione	Devianza	Gradi di libertà	Varianza	F	P
Specie	4882,66	2	2441,33	8,572	< 0,01
Individui	17087,34	60	284,789		
Totale	21970	62			

Confronto tra confusus *e* vagabundus.

Origine variazione	Devianza	Gradi di libertà	Varianza	F	P
Specie	201,52	1	201,520	0,819	> 0,05
Individui	9848,10	40	246,203		
Totale	10049,62	41			

Confronto tra marginatus *e* confusus + vagabundus

Origine variazione	Devianza	Gradi di libertà	Varianza	F	P
Specie	4681,141	1	4681,141	16,516	< 0,01
Individui	17288,859	61	283,424		
Totale	21970	62			

DIFFERENZE BIOLOGICHE TRA LE DUE SPECIE

Allo scopo di completare il quadro delle differenze tra queste tre specie, servendoci dei dati stessi ricavati dagli esperimenti di incrocio, illustreremo alcune loro caratteristiche biologiche. Le deduzioni che seguono si intendono valide, ovviamente, solo nell'ambito delle condizioni sperimentali adottate.

Nella Tabella 3 si riportano i dati relativi alla longevità, in giorni, delle 21 femmine, per ciascuna specie, di cui fu seguita l'intera progenie, dal giorno dell'ultima muta fino alla morte. Per la elaborazione statistica dei dati si è impiegata l'analisi della devianza.

Il primo confronto mette in evidenza una eterogeneità nella longevità delle tre specie; dal secondo si deduce che le differenze di longevità tra *confusus* e *vagabundus* non sono significative; il terzo confronto, infine, conferma che

l'eterogeneità del primo confronto è dovuto alle differenze tra *marginatus* e le altre due specie, insieme considerate. Dunque, la longevità delle femmine adulte di *marginatus* deve ritenersi inferiore a quella delle altre due specie, che, al contrario, non si diversificano tra loro.

Nella tabella 4 sono riprodotti e analizzati i dati relativi alla fecondità. Come si è detto, la conta dei figli, ottenuti da ogni deposizione, venne effettuata subito dopo l'ultima muta. In realtà, quindi, i dati ottenuti rappresentano la fecondità vera e propria, già corretta della mortalità embrionale e preimaginale. Essendosi, peraltro, operato in maniera identica per tutte e tre le specie, ha senso istituire un confronto.

Come risulta dall'analisi della devianza, associata alla tabella 4, anche per la fecondità, intesa nel senso sopra precisato, esiste una indubbia eterogeneità fra le tre specie. Dal confronto *marginatus - vagabundus* non appaiono differenze significative. Il terzo confronto precisa che la differenza è a carico di *confusus* che appare la specie di gran lunga più feconda. Se anche nel periodo preimaginale *marginatus* dovesse subire una maggiore mortalità delle altre due, il che pare confermato da qualche controllo effettuato, ovviamente dovrebbe possedere una fecondità vera, superiore a quella di *vagabundus*. Comunque, già sulla base delle caratteristiche biologiche considerate, sarebbe possibile una differenziazione delle tre specie: tra le due specie più longeve, *confusus* e *vagabundus*, la prima è la più feconda; *marginatus* è la meno longeva ed è scarsamente feconda.

Dopo l'ultima muta, le femmine non sono in grado di deporre immediatamente, occorrendo un periodo pre-riproduttivo o *pre-ovoposizione* di 2-6 giorni per la maturazione degli ovari. Inizia quindi un periodo riproduttivo o *ovoposizione*, in cui le uova vengono deposte una alla volta, a intervalli irregolari. Segue infine un periodo di esaurimento, più o meno lungo, che precede la morte, periodo post-riproduttivo o *post-ovoposizione*. Ciò si verifica, indistintamente, in ciascuna delle tre specie. Se però si compara la frequenza di deposizione in funzione dell'età della madre, è possibile cogliere, nelle tre specie, una diversità di comportamento.

Per dare una visione sintetica del fenomeno, si sono costruiti (fig. 1) tre istogrammi, utilizzando i dati relativi alle 63 femmine degli esperimenti di incrocio di cui si possedeva il numero dei figli, ottenuti dalle uova deposte ad ogni intervallo di 48 ore. In ascisse sono gli intervalli di deposizione; in ordinate le frequenze relative percentuali dei figli ottenuti. Per ogni specie, sono stati cumulati i dati di tutte le 21 famiglie di cui si disponeva. Il numero delle uova, deposte in ogni intervallo, non si identifica evidentemente con gli adulti da esse ottenuti; tuttavia, essendo le due grandezze correlate e grosso modo proporzionali, è da presumere che seguano lo stesso andamento.

Si noti anzitutto come il periodo riproduttivo non si abbrevi nelle specie meno prolifiche, manifestandosi, al contrario, la tendenza opposta. Ma assai

TABELLA 4.

Fecondità delle femmine di confusus, marginatus, vagabundus *e relativa analisi della devianza.*

Specie	Media	Deviazione standard	Coefficiente di variabilità
confusus	59,38	30,66	51,63
marginatus	11,90	9,62	80,84
vagabundus	14,67	12,49	85,14

Analisi della devianza per le tre specie.

Origine variazione	Devianza	Gradi di libertà	Varianza	F	P
Specie	29826,89	2	14913,45	37,626	< 0,01
Individui	23781,43	60	396,36		
Totale	53608,32	62			
Confronto tra confusus *e* vagabundus.					
Specie	80,095	1	80,095	0,644	> 0,05
Individui	4972,477	40	124,312		
Totale	5052,572	41			
Confronto tra marginatus *e* confusus + vagabundus					
Specie	29746,788	1	29746,788	76,45	< 0,01
Individui	23861,540	61	391,173		
Totale	53608,328	62			

più caratteristica di ciascuna specie appare l'andamento del ritmo di deposizione. In *confusus* si ha un primo massimo del 13,19% al 4° intervallo, quando tutte le madri hanno ormai iniziato l'ovoposizione. Il numero dei figli per intervallo si mantiene sostenuto, pur con qualche oscillazione, per altri 8 intervalli e poi crolla rapidamente e definitivamente Al 12° intervallo (24 giorni) le 21 madri complessivamente hanno già deposto l'85% dei figli. Nettamente diverso è il comportamento di *vagabundus* con un massimo netto del 26,38% al terzo intervallo, seguito da altri massimi, intervallati da minimi, assai più protratti nel tempo. Al 24° giorno le 21 femmine di *vagabundus* avevano dato solo il 68% dei propri figli. In definitiva, in *confusus* i figli sono concentrati in un periodo più ristretto (tra il 4° e il 12° intervallo), mentre in *vagabundus*, vengono più scaglionati, nel tempo. La posizione di *marginatus* è intermedia tra questi due casi estremi.

Finalmente, un'ultima informazione vogliamo ancora trarre dai dati dell'esperimento di incrocio. Come risulta da un lavoro precedente (FILIPPONI 1955), le femmine di *confusus* possono essere inseminate reiteratamente; i maschi sono in grado di effettuare più copule; il numero di fecondazioni assicurate, con l'immissione di un'unica spermatofora, è molto esiguo. Confinando femmine vergini con maschi vergini, in identiche condizioni, e per eguale periodo di tempo, il numero di femmine che compariranno nelle rispettive progenie, dipenderà evidentemente, a parità, o a pari eterogeneità di altri fattori, dall'essere stato il maschio più o meno attivo.

Consideriamo ora le progenie ottenute dagli incroci intraspecifici, eseguiti per le tre specie. Le 7 femmine vergini di ciascuna specie erano state confinate, per egual tempo, nelle identiche condizioni, con egual numero di maschi vergini. Se l'attività dei maschi delle tre specie fosse stata diversamente intensa noi dovremmo constatare, nelle rispettive progenie, una differente percentuale di femmine.

I confronti sono stati eseguiti sui dati globali dei 7 incroci intraspecifici, per ciascuna specie, e sono riportati nella tabella 5. La percentuale di femmine è massima in *confusus*, media in *marginatus*, minima in *vagabundus*, e tali differenze sono statisticamente significative. Si è impiegato, come test, il chi quadrato corretto e ci si è limitati a due soli confronti, essendo ovvio che se A > B e B > C è A > C.

TABELLA 5.

Confronto tra le percentuali di femmine delle tre specie, ottenute globalmente dalle 7 famiglie degli incroci intraspecifici, assunte come indice dell'attività sessuale dei maschi.

Specie	Femmina	Maschi	Totale figli	Percentuale femmine
confusus	301	114	415	72,53
marginatus	18	36	54	33,33
vagabundus	25	114	139	17,99

Confronto *confusus* - *marginatus* : chi quadrato = 31,97 P < 0,01
Confronto *marginatus* - *vagabundus*: chi quadrato = 4,44 P = 0,02-0,05

Concludendo, è presumibile che i maschi di *confusus* abbiano una attività sessuale più intensa di quelli di *marginatus*, e questi, a loro volta, più intensa che non i maschi di *vagabundus*. E' interessante segnalare che la vivacità di movimento negli adulti delle tre specie è diversa e diminuisce da una specie all'altra nello stesso ordine, per cui, osservando esemplari vivi, dopo una certa pratica, si può riuscire a individuare la specie, prima di aver esaminati i caratteri diagnostici morfologici.

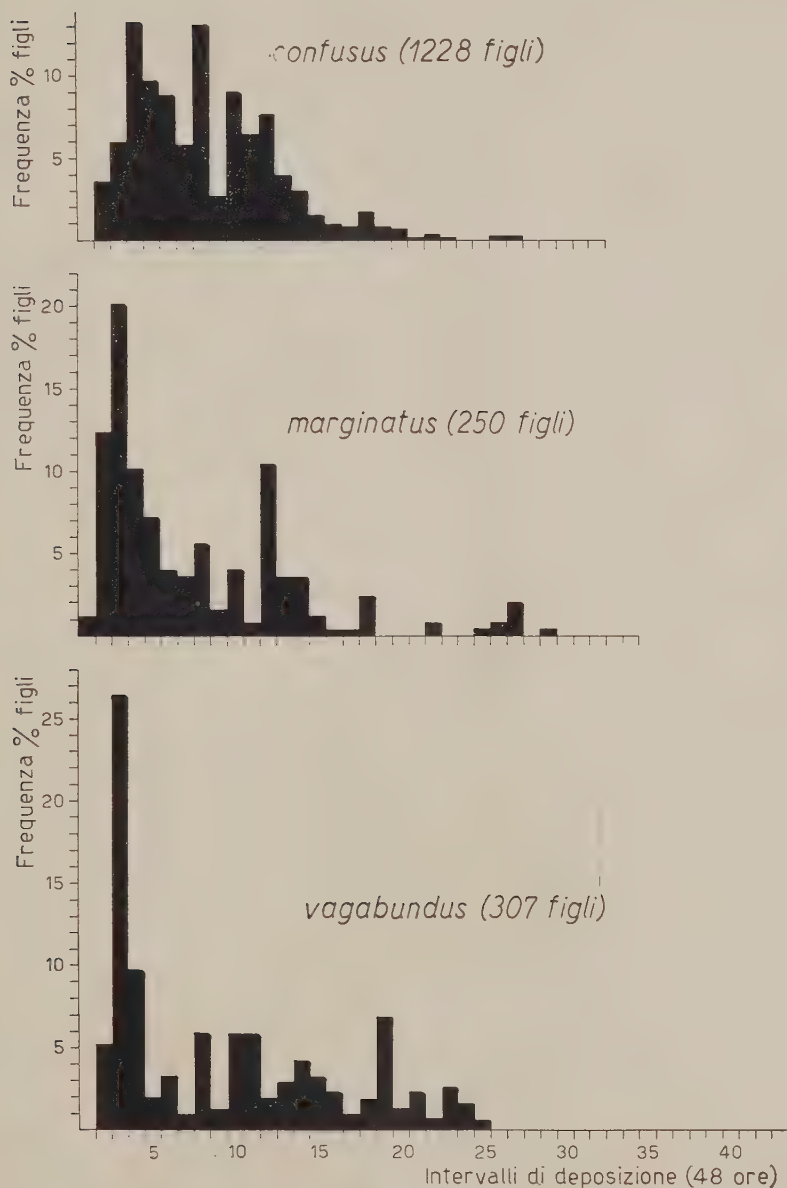


Fig. 1 — Fecondità in funzione dell'età della madre nelle tre specie. In ordinate è il numero, espresso in per cento del totale, dei figli ottenuti dalle uova deposte ad ogni intervallo di 48 ore; in ascisse i successivi intervalli di deposizione. Per ogni specie sono stati cumulati i dati di 21 famiglie.

Discussioni e conclusioni

Ci si era prefisso il compito di sottoporre al vaglio della sperimentazione le asserzioni della Foà (1900) circa i grossi Macrochelidi fimicoli, allo scopo di portare un concreto contributo alla soluzione dei problemi, tuttora esistenti, relativi alla sistematica di questo gruppo di acari. Orbene le osservazioni e gli esperimenti, sopra riferiti, hanno appunto dimostrato che, nei coprotopi dei dintorni di Roma, esistono tre specie di grossi Macrochelidi, tra loro differenziabili morfologicamente, sia nei maschi che nelle femmine, tra loro diverse per caratteristiche biologiche ed etologiche ed, infine, tra loro riproduttivamente isolate. Con qualche rettifica e con qualche aggiunta, i punti di vista di Foà (1900) e di Berlese (1918) risultano, quindi, sostanzialmente confermati, e le tre specie, *Holostaspis confusus* Foà, 1900, *H. marginatus* Berl., 1889 e *H. vagabundus* Berl., 1889, qualunque debba essere la loro denominazione definitiva, rappresentano tre *bonae species*.

Se esistono di fatto tre specie, la tesi della unicità della specie, per i Macrochelidi giganti, sostenuta in pratica da tutti gli autori più recenti, non ha ragione di essere posta. D'altro canto, l'aver provato che nei coprotopi dei dintorni di Roma esistono tre specie non esclude, ovviamente, che, in altri biotopi e in altre regioni, altre ve ne possano essere. Mentre questo lavoro attendeva il turno di pubblicazione, è occorso a noi stessi rinvenire, in una ceppaia marcescente del Parco Nazionale del Circeo, una quarta specie, estremamente affine, con chetotassi diversa, di mole minore, presumibilmente molto rara, e che ora si sta cercando di allevare. Il tentativo di definire quante specie debbano riferirsi a questo gruppo appare quindi, al momento, prematuro.

Che le specie di cui si tratta siano estremamente affini è opinione comune, dal momento che sono state a lungo tra loro confuse e che i sostenitori stessi della pluralità delle specie non riuscivano a distinguere tra loro le femmine. Ma costituiscono esse un complesso tassonomico di livello sopraspecifico, come, unico, sostenne Berlese (1918)? La risposta è, per noi, affermativa. Rimandando, per una documentazione probativa, ad altro lavoro, dove la morfologia di queste specie verrà adeguatamente illustrata, per il materiale in nostro possesso, i caratteri di sottogenere, indicati da Berlese (1918), sono validi, riscontrandosi in tutte le specie del complesso e differenziando queste sia dalle specie del gruppo *Nothrholaspis*, che da quelle del gruppo *Coprholaspis*, e cioè, *Macrocheles sensu stricto*. Occorre solo attribuire al sottogenere un nuovo nome.

Nel corso di questo lavoro, a puro titolo indicativo, si è continuato ad usare l'espressione « grossi macrochelidi fimicoli ». Per quanto si è detto, tale espressione, riferita globalmente alle specie di questo complesso, appare ora impropria, trattandosi di specie non tutte fimicole e, forse, non necessariamente giganti. La quarta specie, di cui si è parlato poco fa, non fu mai rinvenuta in alcun coprotopo, dove invece si trovano ,come componenti abituali, *confusus*,

marginatus, *vagabundus*. E' probabile che non il sottogenere, ma le singole specie siano ecologicamente specializzate. Questo non impedisce tuttavia che. occasionalmente, singoli esemplari possano reperirsi in *habitat*, diversi dal normale, soprattutto nel caso delle specie fimicole che vanno in foresi su coleotteri coprofili. Così potrebbe spiegarsi perchè BERLESE (1889) abbia potuto rinvenire « *in muscis* » il maschio di *vagabundus* su cui descrisse la specie. A noi è occorso di trovare una femmina di *confusus* in una ceppaia marcescente.

I fatti dimostrati, in questo lavoro, e le considerazioni, ora esposte, aprono indubbiamente nuove prospettive, per una più proficua discussione circa quel secondo gruppo di questioni sinonimiche di cui s'è parlato nell'introduzione ;e chiunque voglia accingersi a farlo non potrà, prescindere da queste nuove acquisizioni. Per quanto ci riguarda, una tale discussione si è ritenuto opportuno rimandarla, associandola alla illustrazione dei caratteri morfologici, anche perchè è ancora in atto il confronto con i tipi di altri autori; ed altre utili indicazioni potranno derivarci dallo studio della quarta specie, appena rinvenuta.

RIASSUNTO

Nell'Agro Romano erano state segnalate da FOÀ (1900) tre diverse grosse specie di Macrochelidi fimicoli, con femmine pressochè identiche, *H. marginatus* Berl., 1889, *H. vagabundus* Berl., 1889, *H. confusus* Foà, 1900. Le asserzioni di FOÀ, approvate da BERLESE (1918), furono ignorate dagli autori successivi, fra i quali prevalse il convincimento che i grossi Macrochelidi fossero da riferirsi ad un'unica specie.

Si sono ricercati i topotipi delle specie, sono stati allevati su sterco di cavallo con uova di mosca, sono stati effettuati gli incroci reciproci.

Le tre specie 1) esistono realmente e sono morfologicamente differenziate sia nei maschi che nelle femmine 2) sono tutte arrenotoche, ma ciascuna possiede caratteristiche biologiche ed etologiche proprie 3) sono creofage e predatrici e costituiscono dei componenti costanti dell'acarofauna fimicola; 4) sono infine tra loro sessualmente isolate e possono trovarsi commiste nello stesso coprotopo.

Delle tre specie 1) *confusus* è la più frequente e la più abbondante, ha fecondità e longevità massima, ha i maschi sessualmente più attivi; 2) *marginatus* è meno frequente e meno abbondante della precedente, ha longevità e fecondità minima; 3) *vagabundus* ha longevità massima e fecondità minima, è la meno frequente e la meno abbondante, ha i maschi meno attivi di tutte. La distribuzione dei figli in funzione dell'età della madre ha un andamento diverso nelle tre specie.

Si è rinvenuta una quarta specie, non fimicola, affine alle precedenti. Le quattro specie hanno caratteri comuni che le differenziano sia dal gruppo *Coprholaspis* Berl., 1918, che dal gruppo *Nothrholaspis* Berl., 1918. La tesi di BERLESE (1918) che attribuiva a questo gruppo di specie il valore di sottogenere può essere sostenuta con nuovi argomenti. I risultati ottenuti impongono infine una revisione di tutte le sinonimie relative ai grossi Macrochelidi.

SUMMARY

It was claimed by FOÀ (1900) that in surroundings of Rome there are found three different « big » species of coprocolous Macrochelids, *H. marginatus* Berl., 1889. *H. vagabundus* Berl., 1889. *H. confusus* Foà, 1900, the females of which are nearly identical. This opinion, accepted by BERLESE (1918), has been ignored by more recent authors, whose prevailing view is that all the big coprocolous Macrochelids belong to the same species.

The topotypes of the three species were searched for and found; they were then bred on house fly eggs kept in horse dung; finally, reciprocal interbreeding was carried out.

FOÀ's recorded species thus really exist, but their females, as well as their males, are morphologically differentiated; they are all arrhenotokous, but their biological and ethological characteristics are different; they are carnivorous and predatory, and they may be recognized as constant components of coprocolous fauna; finally, they are sexually isolated and may be found in the same coprotope without interbreeding.

Among the three species: *confusus* is the most commonly found and also the most abundant, its fecundity and longevity are the greatest and its males are the most active sexually; *marginatus* is less common and less abundant, its longevity and fecundity being the least; *vagabundus* is the least common and the least abundant, its longevity the greatest, its fecundity the least, its males being the least active. Plotting the number of offsping against the mothers' age, the trend is not identical in the three species.

A fourth species, related to the previous ones, has been collected from a decomposing tree log. The four species have common characters by which they can be distinguished from the *Copreholaspis* group as well as from the *Nothrholaspis* group. The opinion of BERLESE, who considered this group of species as a subgenus, can now be supported whith new findings. Our results would indicate the necessity of a revision of all the synonyms of the big Macrochelids.

BIBLIOGRAFIA

BERLESE A. (1889): « *Acari, Myriopoda et Scorpiones hucusque in Italia reperta* ». Fasc 52, n. 4, n. 5, n. 8.

BERLESE A. (1918): « Centuria quarta di acari nuovi ». *Redia*, *13*, 115-192.

EVANS G. O. e BROWNING E. (1956): « British mites of the subfamily *Macrochelinae* Trägardh (*Gamasina, Macrochelidae*) ». *Bull. Brit. Mus.* (*Nat Hist.*) *Zool.*, *4*, 3-55.

FILIPPONI A. (1955): « Un nuovo caso di arrenotochia nei Macrochelidi (*Acarina, Mesostigmata*) ». *Riv. Parass.*, *16*, 145-168.

FILIPPONI A. e CERVONE L. (1957): « Isolamento sessuale tra due specie di *Macrocheles*, foretiche e predatrici di *Musca domestica* ». *Riv. Parass.*, *18*, 17-26.

FILIPPONI A. e SEGANTI L. (1957): « Arrenotochia in *Macrocheles subbadius* (*Acarina, Mesostigmata*) ». *Riv. Parass.*, *18*, 27-33.

FOÀ A. (1900): « Esistono il polimorfismo e la partenogenesi nei Gamasidi? ». *Bull. Soc. Ent. It.*, *32*, 121-149.

HULL J. E. (1918): « Terrestrial Acari of the Tyne Province ». *Trans. nat. Hist. Soc. Northumb.* N. S., *5*, 13-88.

HULL J. E. (1925): « Acari of the family *Gamasidae*: new and rare british species ». *Ann. Mag. nat. Hist.* (9) *15*, 201-219.

GOEZE J. A. E. (1776): « Insecten an Thieren und selbst an Insecten ». *Beschäft. Berl. Ges. naturf. Freunde*, *2*, 253-285.

OUDEMANS A. C. (1929): « Kritisch Historisch Overzicht der Acarologie. Tweede Gedeelte, 1759-1804 ». *Tijdsch. Ent.*, *72*, Suppl. XVII - 1097.

OUDEMANS A. C. (1936): « Kritisch Historisch Overzicht der Acarologie ». Deerde Gedeelte, A., E. J. Brill, Leiden, XX + 430.

PEREIRA C. e DE CASTRO M. P. (1945): « Contribuição para o conhecimento de espécie tipo de *Macrocheles* Latr. (*Acarina*): *M. muscaedomesticae* (Scopoli, 1772) emend. *Arq. Inst. Biol. S. Paulo*, *16*, 153-186.

SELLNICK M. (1931): « Zoologische Forschungreise nach den Jonischen Inseln und dem Peloponnes von Max Beier, Wien. Acari ». *S. B. Akad. Wiss. Wien*, *140*, 693-776.

SELLNICK M. (1940): « Die Milbefauna Islands ». *Göteborg. Vetensk Samh. Handl.* (5) 6b, *14*, 1-129.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 2 - Aprile 1958

MICOSI DEI CROSTACEI DECAPODI MARINI

MAURO SORDI (*)

Da alcuni anni (con maggior precisione dal 1950, anno della ricostruzione dell'Acquario Comunale di Livorno, dove sono state compiute le osservazioni e ricerche qui riferite) avevo più volte notato che la morte dei Crostacei Decapodi, in particolare aragoste (*Palinurus vulgaris*) e lupicanti (*Homarus vulgaris*) si verificava di regola, sia per gl'individui adulti sia per i giovani, al tempo della muta, e precisamente durante il suo svolgimento. Dapprima il fatto non fu preso in seria considerazione e si pensò che i decessi potessero attribuirsi a traumi riportati durante il difficile atto della muta. Si escluse che altri animali danneggiassero i crostacei allorchè, lasciata l'exuvie, questi presentano il corpo facilmente vulnerabile: infatti la morte colpiva questi crostacei prima che la muta fosse terminata. Negli ultimi due anni, essendo cresciuta la mortalità, cercai di individuarne le cause. Sono ora in grado di riferire quanto ho potuto accertare, riservandomi di pubblicare in seguito i risultati delle osservazioni e delle esperienze in corso.

Ma prima di tutto ringrazio sentitamente il prof. ALBERTO RAZZAUTI, direttore dell'Acquario Comunale di Livorno per avermi consentito lo svolgimento di questo lavoro.

1) *Osservazioni macroscopiche.*

L'indagine macroscopica sugli animali morti durante la muta poche volte ha permesso di individuare alcune caratteristiche che si possono ritenere sintomi morbosi: macchie nere irregolari più o meno estese sul ventaglio caudale e annerimento del dermascheletro toracico, specialmente alla base dei pereiopodi. Furono appunto questi annerimenti, spesso estesi ai primi articoli delle stesse zampe, a convergere la mia attenzione sulle branchie, che, come è noto, sono formate dall'epipodite degli arti. Infatti, non appena venga asportata la parte del carapace che le protegge, le branchie presentano un aspetto manife-

(*) *Laboratorio di biologia marina dell'Acquario Comunale di Livorno.*

stamente patologico. Il colore di queste che di regola è quasi perfettamente bianco, è grigio più o meno scuro (fig. 1). Alcune branchie presentano devastazioni e con un po' d'attenzione si può vedere che gran parte dei filamenti branchiali sono troncati a metà (fig. 2). Gli annerimenti citati poco fa partono dalla base delle branchie più danneggiate e si estendono anche alle pareti della camera branchiale. Ma non sempre i sintomi sono così evidenti: qualche volta le branchie stesse, anche se, come rivelerà il microscopio, sono colpite da micosi, sembrano sane e sono bianche o appena grige.

2) *Indagini microscopiche.*

Le osservazioni microscopiche furono condotte:

1) su materiale fresco o fissato, prelevato dal dermascheletro (dove questo presentava gli annerimenti su menzionati) e dal tessuto muscolare sottostante;

2) su materiale ricavato dalle camere branchiali e, in particolare, dalle branchie stesse.

Le ricerche sul dermascheletro sono molto difficili per la durezza della chitina calcificata e l'opacità delle parti annerite; cosicchè nè con la decalcificazione nè con la diafanizzazione si riesce a vedere alterazioni o altre particolarità. Le sezioni del tessuto muscolare sottostante alle parti annerite del tegumento non hanno rivelato anomalie o lesioni. Invece l'indagine microscopica sulle branchie, in quasi tutti i casi esaminati, sia in *Palinurus* sia in *Homarus*, ha permesso di distinguere due diversi miceti, diffusi nell'interno dei filamenti branchiali; di constatare la presenza piuttosto frequente di un Nematode e delle sue uova, spesso embrionate, e quella saltuaria di Acineti, insediati esternamente ai filamenti branchiali. La diffusa infezione micotica si è sempre manifestata come il più grave dei suddetti fatti parassitari.

I filamenti branchiali sono abbastanza sottili e diafani da consentire di vedere per trasparenza, già con un debole ingrandimento, i miceti diffusi nelle branchie. Diafanizzando con lattofenolo o con altri liquidi, senza colorazione o colorando con vari metodi, ed anche nelle sezioni eseguite dopo inclusione in paraffina è stato possibile distinguere particolari necessari per definire la posizione sistematica dei citati funghi parassiti. Nei paragrafi seguenti indicherò provvisoriamente il più diffuso di questi con il n. 1 e l'altro, che non ho mai trovato solo ma sempre associato col primo, con il n. 2.

a) *Descrizione del micete n.* 1.

Il micelio, ramificato, è costituito da ife ialine, settate, con vacuoli, dello spessore di μ 2-3. All'estremità delle ife, senza che si producano distinti conidiofori, sono generati i conidi, uno di seguito all'altro. Questi si staccano in diversi tempi e finiscono per infarcire completamente i filamenti branchiali



Fig. 1 — Aragosta presentante le branchie annerite e devastate da *Ramularia branchialis* e *Didymaria palinuri*. E' stata asportata una parte del carapace.

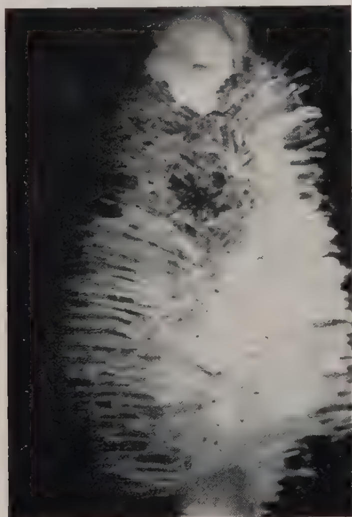


Fig. 2 — Una branchia di aragosta che presenta distruzioni specialmente apicali.

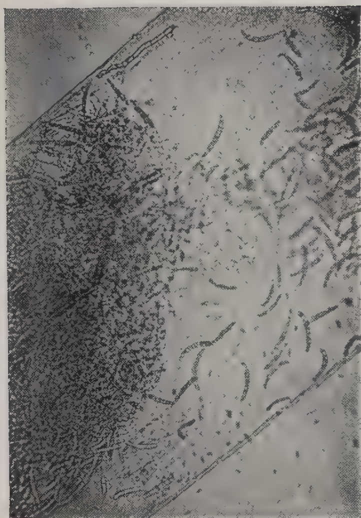


Fig. 3 — Filamento branchiale invaso dai conidi di *Ramularia branchialis.*



Fig. 4 — Eruzione di conidi di *Ramularia branchialis.*



Fig. 5 — Filamenti branchiali da cui erompe il micelio.

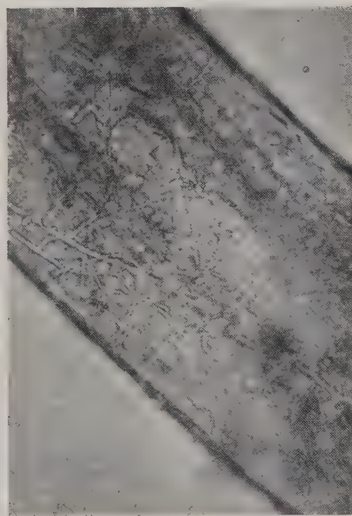


Fig. 6 — Filamento branchiale invaso da *Didymaria palinuri.*

(fig. 3). Raggiungono la lunghezza di μ 50-55 e sono allora esacellulari, assottigliati agli estremi e lievemente falciformi, ialini, incolori. In seguito a rottura della parte distale dei filamenti il micelio può erompere e continuare a produrre conidi (fig. 4). Frequentemente, subito al di sotto della rottura i filamenti branchiali presentano una successione di zone rifrangenti e colorate in nero, rosso e giallo (fig. 5). Ma quando l'infezione è progredita i filamenti cadono completamente. Non sono riuscito ad identificare nessuna differenza morfologica tra il micete parassita di *Palinurus* e quello di *Homarus;* anche le misure corrispondono.

b) *Descrizione del micete n. 2.*

Il micelio è formato da ife settate, ramificate, ialine dello spessore di μ 3 circa (fig. 6). A differenza del precedente non erompe mai, almeno per quanto ho potuto osservare, dai filamenti branchiali in cui è diffuso e spesso associato al micete n. 1. Si distingue bene per i conidi, sempre bicellulari, grandi costantemente μ 12-13, formati da cellule sferiche o ellissoidali, portati individualmente da sottili e lunghi conidiofori.

3) *Posizione sistematica dei due miceti.*

Gli elementi diagnostici raccolti fino a questo momento, senza avere eseguito nessun tentativo di coltivare i miceti sopra descritti, (*) sarebbero appena sufficienti per potere definire la posizione sistematica e le affinità delle due nuove specie se non ci soccorresse l'importante monografia di Mann e Pieplow: « Die Brandfleckenkrankheit bei Krebsen und ihre Erreger ». Gli A. descrivono tre miceti: *Ramularia astaci, Septocylindrium eriocheir* e *Didymaria cambari,* agenti di un morbo, caratterizzato da macchie nere (*Brandflecken* ossia bruciature) e lesioni del dermascheletro, che colpisce Crostacei d'acqua dolce e salmastra: rispettivamente *Astacus astacus, Eriocheir sinensis* e *Cambarus affinis.* La sintomatologia delle micosi descritte dai suddetti A. differisce sostanzialmente da quella delle micosi da me studiate: basti considerare la diversa localizzazione. Ma quando procediamo all'analisi delle due specie illustrate e confrontiamo questi caratteri con quelli delle specie descritte degli Autori tedeschi troviamo grandi analogie. Ometto di riferire qui la discussione che porta a definire la posizione sistematica di tutti questi miceti. Il micete n. 1 da me descritto deve collocarsi nel genere *Ramularia;* propongo per questo il nome *branchialis.* Il micete n. 2 invece deve porsi nel genere *Didymaria;*

(*) Nel tempo trascorso fra la consegna del manoscritto e la revisione delle bozze di stampa sono riuscito a coltivare e trapiantare ripetutamente *Ramularia branchialis* su terreno preparato con la formula: agar g 1,5, glucosio g 1, acqua di mare alquanto diluita g 100. Posso confermare la diagnosi e la posizione sistematica di *Ramularia branchialis.*

gli attribuisco il nome specifico *palinuri*. Riassumo nel seguente specchio la posizione delle due nuove specie:

Fungi imperfecti.

Ordine: *Hyphomycetes*
Famiglia: *Mucedinaceae* Link

Sezione: *Hyalophragmiae* Sacc.
Genere : *Ramularia* Ung.
Ramularia branchialis n.sp.

Sezione: *Hyalodidymae* Sacc.
Genere : *Didymaria* Corda
Didymaria palinuri n. sp.

Morfologicamente *Ramularia branchialis* (fig. 7) si distingue da *R.astaci* MANN e PIEPLOW per questi caratteri: conidi maturi esacellulari invece che tetracellulari; maggiore dimensione degli stessi (μ 50-55 invece che 40); produ-

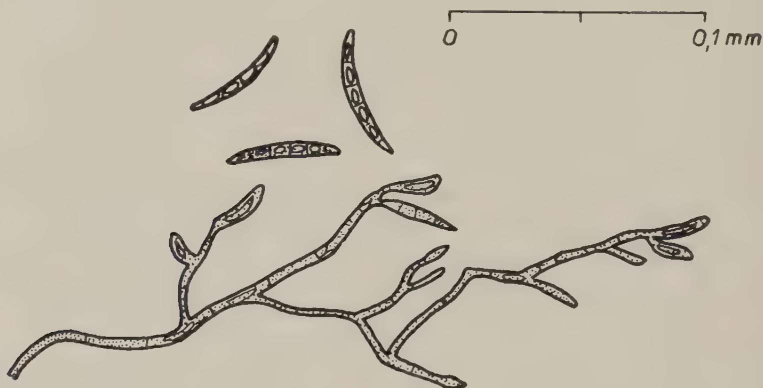


Fig. 7 — *Ramularia branchialis* n. sp.

zione anche interna al corpo dell'ospite. Ma certo contano di più le differenze nell'azione patogena. Le stesse considerazioni possono farsi al riguardo di *Didymaria palinuri*, confrontandola con *D. cambari* MANN e PIEPLOW: le differenze morfologiche sembrano anche minori. Infatti non ho potuto accertare se i conidi si producono uno dopo l'altro rimanendo agglutinati al conidioforo, come hanno descritto MANN e PIEPLOV, oppure ogni conidioforo produce un solo conidio, (fig. 8). Comunque sia, sede ed effetti del parassita sono del tutto diversi da quelli di *Didymaria cambari.*

Dopo queste considerazioni penso che fino da ora e anche prima di ricerche più estese e approfondite sia possibile individuare le due nuove specie di miceti parassiti con le seguenti diagnosi:

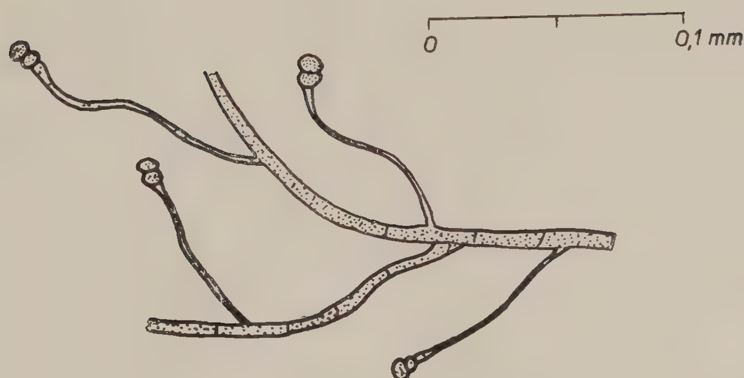


Fig. 8 — *Didymaria palinuri* n. sp.

Ramularia branchialis n. sp.

Mycelio ramoso in branchiarum filis Palinuri vulgaris et Homari vulgaris luxuriante atque deinde e filis fractis erumpente.

Hyphis hyalinis, septatis, μ *2-3 spissis.*

Conidiis hypharum extremitate aliis post alios generatis; et intra branchiarum fila et, his vastatis, maxima copia, extra productis.

Conidiis maturis sex cellulis constitutis, apice attenuatis, sicut falcibus formatis, hyalinis, sine colore, usque ad μ *50-55 longis.*

Hic fungus Palinuri atque Homari branchias vastat, quorum animalium exitus causa est.

Didymaria palinuri n. sp.

Mycelio ramoso in Palinuri vulgaris branchiis luxuriante. Hyphis hyalinis, septatis, circiter μ *3 spissis. Conidiis hyalinis,* μ *12-13 longis, duabus sferoideis vel ellypsoideis cellulis constitutis, longis et subtiiibus conidiophoris singulatim latis.*

Hic fungus saepe cum Ramularia branchiali *conjunctus Palinuri branchias invadit.*

4) *Specificità dei due miceti.*

Ramularia branchialis nov. sp. sembra essere morfologicamente identica in *Palinurus vulgaris* ed in *Homarus vulgaris*. Per potere confermare la identità è necessario eseguire, se sarà possibile, infezioni sperimentali e colture di *Ramularia* partendo da conidii isolati rispettivamente da *Palinurus* e da *Homarus*. Il prelevamento si presenta assai facile. Bisogna vedere se il terreno colturale esperimentato da Mann e Pieplow con ottimi risultati si presterà,

con qualche modifica o aggiunta eventuali, alla coltura del micete in questione. (*) Nella coltura potranno forse identificarsi diversità morfologiche o fisiologiche.

Riguardo alla possibilità di infettare sperimentalmente gli stessi Crostacei ed eventualmente altre specie sarà difficile escludere che gli animali siano già naturalmente affetti da micosi. Ulteriori ricerche permetteranno di accertare se il parassita in natura infetti altre specie di Crostacei Decapodi marini. Pare probabile che le altre specie del genere *Palinurus* possano essere affette dalle stesse micosi.

L'altra specie da me descritta, *Didymaria palinuri*, sembra avere minore aggressività e minore importanza quale agente patogeno; infatti è meno diffusa e finora l'ho trovata soltanto in *Palinurus*. I conidi sono prodotti in quantità non grande e perciò le possibilità di diffusione di questo fungo sembrano limitate. Probabilmente sarà possibile ottenere colture e infezioni sperimentali anche con questa specie.

5) *Trasmissione della micosi.*

L'enorme numero di conidi prodotti da *Ramularia branchialis*, la disseminazione di questi sia durante la vita sia dopo la morte dei Crostacei infetti, la possibilità che gli stessi conidi possiedono di rimanere a lungo sospesi nell'acqua marina sono i fattori della diffusione del morbo. I conidi dell'altra specie, *Didymaria palinuri*, che sono prodotti solo internamente ai filamenti branchiali, possono uscirne, probabilmente, in conseguenza delle distruzioni prodotte da *Ramularia*.

Come avviene l'infezione dei Crostacei? Presumibilmente attraverso lesioni delle branchie o forse anche d'altre parti del corpo, per le quali i conidi possono penetrare. Anche a questa questione gli esperimenti potranno dare esauriente risposta.

6) *Danni prodotti dalle micosi.*

Non credo che sia necessario spendere parole per dimostrare quanto grave sia il danno prodotto dal morbo che colpisce i grandi Decapodi marini commestibili, uccidendoli, presumibilmente per asfissia, di solito nella fase cruciale della muta, quando è richiesta l'integrità delle forze e delle funzioni.

Qual'è la diffusione del morbo? Non posso rispondere, nè potrò finchè altri, in altre località, non abbiano raccolti sufficienti elementi per definire la distribuzione geografica e l'incidenza locale della micosi.

E' da presumere che la diffusione delle micosi fra i suddetti Decapodi

---

(*) Vedasi la nota a pag. 133. Il terreno usato da me differisce da quello di Mann e Pieplow per contenere acqua di mare alquanto diluita invece che acqua dolce. Il micete da me coltivato finora è stato prelevato da *Homarus vulgaris*.

venga facilitata dalla vita in cattività negli acquari e che in natura sia meno frequente di quanto si sia osservato durante le ricerche condotte nell'Acquario Comunale di Livorno. E' evidente che la diffusione della micosi negli acquari potrà in parte essere prevenuta evitando l'introduzione di esemplari che presentino annerimenti del dermascheletro, specialmente nella regione ventrale del torace e sulle zampe.

Sono commestibili i Crostacei infetti? Per ora non si conoscono manifestazioni patologiche nell'Uomo che siano sicuramente imputabili all'ingestione di Crostacei affetti da micosi ma, forse, non è eccesso di prudenza rifiutare gli esemplari che presentino annerimenti estesi e distruzioni delle branchie.

RIASSUNTO

L'autore descrive due nuove specie di Fungi imperfecti, *Ramularia branchialis* e *Didymaria palinuri*, che attaccano le branchie di *Palinurus* ed *Homarus* ed illustra i danni sofferti da questi Crostacei.

SUMMARY

Two new species of Fungi imperfecti, *Ramularia branchialis* and *Didymaria palinuri*, parasites in the gills of *Palinurus* and *Homarus* and the damages suffered by these crustaceans are described.

BIBLIOGRAFIA

ALLESHER A. e LINDAU G. (1884 e segg.): Fungi imperfecti, in « Cryptogamenflora Deutschlands, Osterreichs und der Schweiz » di RABENHORST.

FERRARIS T. (1941): Trattato di patologia e terapia vegetale, 4a ed. Milano.

MANN H. e PIEPLOW U. (1938): Die Brandfleckenkrankheit bei Krebsen und ihre Erreger. *Zeitschr. f. Fischerei*, *36*, 225-240.

PENSO G. (1950): I prodotti della pesca, Milano.

SCHAPERCLAUS W. (1954): Fischkrankheiten, 3 Auf. Berlin, 432-435.

SACCARDO P. A. (1882 e segg.): Sylloge fungorum, (continuata da A. TROTTER).

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 2 Aprile 1958

CHEMICALS AFFECTING THE PREIMAGINAL STAGES OF THE HOUSEFLY. VII. (*) THE CONTACT TOXICITY OF SOME ALKYL BROMO- AND CHLOROACETATES FOR THIRD STAGE LARVAE

K. R. SIMON ASCHER (**)

Introduction

It has been shown recently (Ascher 1957) that some of the alkyl bromoacetates (decyl, lauryl, myristyl and cetyl bromoacetate) possess a moderate residual contact toxicity against houseflies, the best initial k. d. properties being exhibited by the lauryl compound. During a study on the effect of these compounds when injected into houseflies (to be published at a later date), it became evident that the rate of penetration plays an overriding rôle in this series and it was thus deemed necessary to employ a test method which gives some indications about rate of cuticular penetration. Contact of long duration with third stage prepupating housefly larvae (Ascher and Levinson - Part III) was used for this purpose. The corresponding chloroacetates were tested, for comparison, in the same way, though it has been shown — for adults — in the previous study (Ascher 1957), that the alkyl chloroacetates are inferior to the corresponding bromoacetates as far as initial k. d. is concerned.

Materials and methods

Chemicals.

The following alkyl bromoacetates and alkyl chloroacetates were employed.

Compound	*b. p.*	*Molecular weight*
Decyl bromoacetate	98-100°/0.03 mm	279.22
Lauryl bromoacetate	172-174°/6 mm	307.27
Myristyl bromoacetate	137°/1 mm	335.32
Cetyl bromoacetate	206°/2 mm; 184 - 186°/0.4 mm	363.38
Stearyl bromoacetate	m. p. 35°	391.43

(*) Part. VI: *Riv. Parassit. 17*, 51 (1956).

(**) *Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma.*

Compound	*b. p.*	*Molecular weight*
Decyl chloroacetate	118°/0.2 mm	234.76
Lauryl chloroacetate	126 - 130°/0.3 mm	262.81
Myristyl chloroacetate	150 - 153°/ 0.5 mm	290.86
Cetyl chloroacetate	165°/1 mm; m. p. 23°	318.92
Stearyl chloroacetate	m. p. 28-30°	346.97

All the compounds, except decyl and stearyl chloroacetate, were the same as used in the previous study (ASCHER 1957). The latter two were synthesized for this study by M. BOCCACCI.

Biological Material.

Prepupating larvae of a Swiss DDT- and multiresistant strain (K_1), and a susceptible Italian strain (S) of *Musca domestica* L. were used, the larvae being obtained by the procedure described in Part III.

Test Procedure.

The test procedure in closed dishes was the same as previously described (Part III), except that larger Petri dishes (of a diameter of 15 cm) were employed and 1.54 cc of the acetone solutions was applied to the filter paper in the dishes. For each test about 50 larvae were employed, most of the tests being repeated at least 2 - 3 times on different days.

In open dish tests, the procedure previously described was simplified by gluing the filter paper at its circumference to the bottom of the Petri dish. All open tests were carried out in a separate incubator.

RESULTS AND DISCUSSION

In the tabulation of the results, larvae and pupae were classified as follows:

Dead larvae.

Sclerotinized larvae - i. e. larvae which failed to contract fully or partially and became hardened and pigmented.

Partly pupated larvae - in which only the anterior part of the body has become hardened and pigmented.

Abnormal pupae - semilunar forms, pupae with pointed ends, forms with an anterior open pore, pupae with unretracted mouth parts, and other deformities.

Exposure to residues of gamma-BHC induced one more different form of abnormal pupae, called in this study « *Gamma-BHC pupae* ». These pupae exhibit an almost normal exterior form except for the segments which stand out prominently. No adults are emerging from « gamma-BHC pupae ».

As elaborated in Part III, rapidly penetrating toxic substances, when applied at an adequate concentration, bring about a high percentage of dead larvae, while in toxic substances with a slower rate of penetration, the larvae succeed in reaching intermediate stages in their way towards pupation (sclerotinized larvae, partly pupated larvae), or even in forming abnormal pupae.

The results with strains K_1 and S in closed and open dishes are summarized in Tables 1a — 4a, 1b — 4b.

The very high larval mortality for 1.0 g/sq. m. decyl and lauryl bromoacetates proves the high penetrating properties and the speed of action of these two compounds — as compared with gamma-BHC, which induces practically no larval mortality in these experiments, but causes disturbances at a later stage (« gamma-BHC pupae »). At the lower concentration (0.5 g/sq. m.), only lauryl bromoacetate is still active in the same way.

Similar to the alkyl thiocyanates (MARTIN 1946), the alkyl bromoacetates present us with an example of the classical approach of the division of a toxic molecule into a toxophoric group (bromoacetate) and a conductophoric group (alkyl radical) whose function it is to insure penetration to the site of action.

The best k. d. properties in tests against adult houseflies were exhibited by lauryl bromoacetate (ASCHER 1957). In the present work, lauryl bromoacetate had the highest activity among the alkyl bromoacetates in both the K_1 and the S strain, and lauryl chloroacetate — among the corresponding chloroacetates — in the K_1 strain. Thus here again, as in the case of thiocyanates (MURPHY and PEET 1932, 1933, BOUSQUET *et al.* 1935, BUSVINE 1945, MARTIN 1948), cyanides (BROWN *et al.* 1948), the potassium soaps (DILLS and MENUSAN 1935) and (at least in some cases) the free acids (SIEGLER and POPENOE 1925, LEVINSON and ASCHER 1954), the greatest effect is shown by the C_{12} (lauryl) derivative. BROWN (1951) observes the following on this phenomenon:

« The superior surface activity of lauric acid is probably an important factor in the effectiveness of thiocyanoethyl laurate as a knockdown contact poison. It is nevertheless probable that a superior cuticle permeability consequent upon liposolubility, is also a main factor in the contact efficacy of lauric acid and the laurate esters and of lauryl thiocyanate and lauryl cyanide ».

This statement may thus well be extended to include also lauryl bromoacetate and in some cases, lauryl chloroacetate.

The higher activity of bromoacetates as compared with the chloroacetates, which has been confirmed again, may be due to the release of bromide ions, as postulated in our previous paper. It has however to be borne in mind, that also the lower molecular weight of the chloroacetates may play a part in their

TABLE 1a.

Bromoacetates, K_1 in closed dishes; T = 30°C

COMPOUND	Rate g/sq. m.	No. of Larvae employed	Mean Percentage of: Dead Larvae	Sclerotinized Larvae	Partly pupated Larvae	Abnormal Pupae	Pupae of normal appearance	Adults' Emergence calculated on Larvae
Decyl bromoacetate	1.0	3 × 50	99.3	—	—	—	**0.7**	0
Lauryl bromoacetate	1.0	3 × 50	88.2	2.0	3.3	2.5	**4.0**	1.3
Myristyl bromoacetate	1.0	5 × 50	9.8	—	5 9	15.7	**68.6**	19.6 (1)
Cetyl bromoacetate	1.0	3 × 50	7.4	1.1	6.3	8 8	**76.4**	59.1
Stearyl bromoacetate	1.0	3 × 50	4.0	—	3.0	—	**93.0**	74.0
Gamma-BHC	1.0	2 × 50	11.0	—	—	71.0 (2)	**18.0**	14.0
Control		3 × 50	0.6	—	—	—	**99.4**	86.1
Decyl bromoacetate	0.5	2 × 50	12.6	7.0	8.0	19.5	**52.9**	33.9
Lauryl bromoacetate	0.5	2 × 50	51.6	5.0	17.3	19.7	**6.4**	1.6
Myristyl bromoacetate	0.5	3 × 50	7 4	4.2	6.2	6.2	**76.0**	41.7 (1)
Cetyl bromoacetate	0.5	2 × 50	—	—	—	5.0	**95.0**	90.4
Stearyl bromoacetate	0.5	2 × 50	—	—	—	4.0	**96.0**	72.0
Gamma-BHC	0.5	2 × 50	14 9	—	—	74.5 (2)	**10.6**	10.6
Control		2 × 50	1.0	—	—	—	**99.0**	90.0
Decyl bromoacetate	0.1	2 × 50	—	—	—	—	**100**	72.8
Lauryl bromoacetate	0.1	2 × 50	—	3.5	—	2.5	**94.0**	77.0
Myristyl bromoacetate	0.1	2 × 50	—	1.0	—	2.8	**96.2**	89.6
Cetyl bromoacetate	0.1	2 × 50	—	—	—	—	**100**	81.0
Stearyl bromoacetate	0.1	2 × 50	2.0	—	—	—	**98.0**	80.0
Gamma-BHC	0.1	2 × 50	25.7	2.8	6.8	38.0 (3)	**26.7**	20.8
Diazinon	0.1	2 × 50	71.1 (4)	18.4	—	10.5	**0**	0
Control		1 × 50	3.0	—	—	—	**97.0**	85.0

(1) Results strongly fluctuating; (2) « gamma-BHC pupae »; (3) 26.6% « gamma-BHC pupae », 11.4% other abnormal pupae; (4) Dead and moribund larvae.

TABLE 1b.

Bromoacetates, S in closed dishes; T = 30°C.

COMPOUND	Rate g/sq. m.	No. of Larvae employed	Mean Percentage of: Dead Larvae	Sclerotinized Larvae	Partly pupated Larvae	Abnormal Pupae	Pupae of normal appearance	Adults' Emergence calculated on Larvae
Decyl bromoacetate . . .	1.0	2 × 50	95.1	—	1.0	—	**3.9**	1.0
Lauryl bromoacetate . . .	1.0	2 × 50	92.0	—	1.0	2.0	**5.0**	5.0
Myristyl bromoacetate . .	1.0	4 × 50	5.0	3.0	8.3	40.5	**43.2**	17.1 (1)
Cetyl bromoacetate . . .	1.0	2 × 50	—	—	—	7.1	**92.9**	65.1
Stearyl bromoacetate . . .	1 0	2 × 50	1.0	—	—	10.0	**89.0**	75.0
Gamma-BHC	1.0	2 × 50	—	—	—	93.9 (2)	**6.1**	5.2
Control		2 × 50	—	—	—	—	**100**	89.8
Decyl bromoacetate . . .	0.5	2 × 50	11.8	22.3	2.0	33.4	**30.5**	26.2
Lauryl bromoacetate . . .	0 5	2 × 50	83.0	—	—	8.0	**9.0**	4.0
Myristyl bromoacetate . .	0.5	4 × 50	4.0	—	—	16.0	**80.0**	46.0 (1)
Cetyl bromoacetate . . .	0.5	2 × 50	—	—	—	2.0	**98.0**	88.0
Stearyl bromoacetate . . .	0.5	2 × 50	1.0	—	—	1.0	**98.0**	70.0
Gamma-BHC	0.5	2 × 50	1.0	—	—	90.0 (2)	**9.0**	8.1
Control		2 × 50	—	—	—	—	**100**	85.0
Decyl bromoacetate . . .	0.1	1 × 50	2.0	—	—	—	**98.0**	88.0
Lauryl bromoacetate . . .	0.1	1 × 50	—	—	—	—	**100**	82.0
Myristyl bromoacetate . .	0.1	2 × 50	—	—	—	—	**100**	84.6
Cetyl bromoacetate . . .	0.1	1 × 50	—	—	—	—	**100**	90.0
Stearyl bromoacetate . . .	0.1	2 × 50	—	—	—	—	**100**	95.8
Gamma-BHC	0 1	1 × 50	4.0	—	—	82.0 (2)	**14.0**	8.0
Control		1 × 50	—	—	—	—	**100**	80.0

(1) Results strongly fluctuating; (2) «gamma-BHC pupae».

TABLE 2a.

Bromoacetates, K_1 in open dishes; $T = 30°C$.

COMPOUND	Rate g/sq. m.	No. of Larvae employed	Mean Percentage of: Dead Larvae	Sclerotinized Larvae	Partly pupated Larvae	Abnormal Pupae	Pupae of normal appearance	Adults' Emergence calculated on Larvae
Decyl bromoacetate . . .	1.0	3 × 50	92.7	—	—	2.0	**5.3**	0.7
Lauryl bromoacetate . . .	1.0	3 × 50	94.7	—	—	1 8	**3.5**	1.1
Myristyl bromoacetate . . .	1.0	4 × 50	32.4	—	25.2	22.2	**20.2**	9.0 (1)
Cetyl bromoacetate . . .	1.0	3 × 50	6.0	—	3.0	7 0	**84.0**	54.0
Stearyl bromoacetate . . .	1 0	3 × 50	11.2	—	2.0	10.2	**76.6**	51.3
Gamma-BHC	1.0	3 × 50	10.0	2.0	—	76.0 (2)	**12.0**	12.0
Control		3 × 50	1.3	—	—	0.7	**98.0**	81.2
Decyl bromoacetate . . .	0.5	3 × 50	19.9	–	7.0	27.6	**45.5**	32.2
Lauryl bromoacetate . . .	0.5	3 × 50	81.1	—	3.8	5.3	**9.8**	3.3
Myristyl bromoacetate . . .	0.5	4 × 50	16.4	—	3.0	26.0	**54.6**	35.1 (1)
Cetyl bromoacetate . . .	0.5	2 × 50	1.0	—	—	5.3	**93.7**	81.1
Stearyl bromoacetate . . .	0.5	2 × 50	10.0	—	—	10.0	**80.0**	50.0
Gamma-BHC	0.5	3 × 50	13.5	—	2.0	62.2 (2)	**22.3**	21.7
Control		2 × 50	—	—	—	—	**100**	90.0
Decyl bromoacetate . . .	0.1	2 × 50	—	—	—	—	**100**	71.5
Lauryl bromoacetate . . .	0.1	2 × 50	—	5.0	—	—	**95.0**	75.0
Myristyl bromoacetate . . .	0.1	2 × 50	—	—	—	—	**100**	80.0
Cetyl bromoacetate	0 1	2 × 50	--	—	—	5.0	**95.0**	80.0
Stearyl bromoacetate . . .	0.1	2 × 50	—	—	—	—	**100**	84.0
Gamma-BHC	0.1	2 × 50	15.6	—	5.2	31.7 (3)	**47.5**	21.0
Diazinon	0.1	2 × 50	40.0	35.0	25.0	—	**0**	0
Control		1 × 50	—	—	—	—	**100**	86.0

(1) Results strongly fluctuating; (2) « gamma-BHC pupae »; (3) 26,5% « gamma-BHC pupae »; 5,2% other abnormal pupae.

TABLE 2b.

Bromoacetates, S in open dishes; T = 30°C.

COMPOUND	Rate g/sq. m.	No. of Larvae employed	Mean Percentage of: Dead Larvae	Sclerotinized Larvae	Partly pupated Larvae	Abnormal Pupae	Larvae of normal appearance	Adults' Emergence calculated on Larvae
Decyl bromoacetate . . .	1.0	2 × 50	100	—	—	—	**0**	0
Lauryl bromoacetate . . .	1.0	2 × 50	98.0	—	—	—	**2.0**	2.0
Myristyl bromoacetate . . .	1.0	4 × 50	11.8	49,0	—	21.6	**17.6**	9.8 (1)
Cetyl bromoacetate . . .	1.0	1 × 50	4.0	—	—	26.0	**70.0**	52.0
Stearyl bromoacetate . . .	1.0	2 × 50	2.0	—	—	36.0	**62.0**	50.0
Gamma-BHC	1.0	1 × 50	—	—	—	94.0 (2)	**6.0**	6.0
Control		1 × 50	—	—	—	—	**100**	96.0
Decyl bromoacetate . . .	0.5	2 × 50	25.5	—	—	49.0	**25.5**	25.5
Lauryl bromoacetate . . .	0.5	1 × 50	92.0	—	—	4.0	**4.0**	2.0
Myristyl bromoacetate . . .	0.5	4 × 50	12.2	—	—	35.6	**52.2**	29.1 (1)
Cetyl bromoacetate. . . .	0.5	2 × 50	—	—	—	11.8	**88.2**	68.6
Stearyl bromoacetate . . .	0.5	2 × 50	8.0	—	—	16.0	**76.0**	52.0
Gamma-BHC	0.5	2 × 50	—	—	—	91.8 (2)	**8.2**	8.2
Control		1 × 50	—	—	—	—	**100**	94.0
Decyl bromoacetate . . .	0.1	2 × 50	—	—	—	—	**100**	96.0
Lauryl bromoacetate . . .	0.1	2 × 50	2.0	—	—	2.0	**96.0**	86.0
Myristyl bromoacetate. . .	0.1	2 × 50	—	—	—	—	**100**	92.1
Cetyl bromoacetate	0.1	2 × 50	—	—	—	—	**100**	79.6
Stearyl bromoacetate . . .	0.1	2 × 50	—	—	—	—	**100**	94.0
Gamma-BHC	0.1	2 × 50	23.6	—	3.9	54.0 (2)	**18.5**	7.4
Control		2 × 50	—	—	—	—	**100**	86.0

(1) Results strongly fluctuating; (2) « gamma-BHC pupae ».

TABLE 3a.

Chloroacetates, K_1 in closed dishes; $T = 30°C$.

COMPOUND	Rate g/sq. m.	No. of Larvae employed	Mean Percentage of: Dead Larvae	Sclerotinized Larvae	Partly pupated Larvae	Abnormal Pupae	Pupae of normal appearance	Adults' Emergence calculated on Larvae
Decyl chloroacetate	1.0	4 × 50	46.0	11.5	3.0	15.0	**24.5**	20.5 (1)
Lauryl chloroacetate	1.0	2 × 50	32.0	26.0	—	26.0	**16.0**	4 0
Myristyl chloroacetate	1.0	2 × 50	6.9	—	—	3.7	**89.4**	73.4
Cetyl chloroacetate	1.0	2 × 50	2.0	—	—	1.0	**97.0**	86.2
Stearyl chloroacetate	1.0	2 × 50	—	—	—	—	**100**	91.7
Gamma-BHC	1.0	1 × 50	—	—	—	88.0 (2)	**12.0**	10.0
Control		3 × 50	1.3	—	—	—	**98.7**	92.0
Decyl chloroacetate	0.5	2 × 50	1.0	—	—	2.0	**97.0**	85.0
Lauryl chloroacetate	0.5	2 × 50	2.0	—	—	12.7	**85.3**	61.0
Myristyl chloroacetate	0.5	2 × 50	—	—	—	3.3	**96.7**	90.0
Cetyl chloroacetate	0.5	2 × 50	1.0	—	—	1.6	**97.4**	89.4
Stearyl chloroacetate	0.5	2 × 50	—	—	—	—	**100**	86.0
Gamma-BHC	0.5	2 × 50	—	—	—	87.0 (2)	**13.0**	13.0
Control		1 × 50	—	—	—	—	**100**	92.0

(1) Results strongly fluctuating; (2) « gamma-BHC pupae ».

reduced toxicity. According to RIEMSCHNEIDER (1956), KENAGA (1950), the effective molecular weight of organic contact insecticides lies within the range 270 - 430; decyl and lauryl chloroacetates which are below this range represent thus rather low pressure fumigants than residual contact insecticides.

On comparing the results obtained with the K_1 and S strains, one notes the striking similarity of the strains in their response to the bromoacetates. The enhanced susceptibility of some resistant strains in the adult stage towards the bromoacetates, as evidenced in *tarsal contact of long duration* (ASCHER 1957, 1958) is thus not seen in the larval stage. But even so, the equitoxicity of the bromoacetates to K_1 and S larvae found in this study in remarkable, inasmuch as larvae of the K_1 strain are more tolerant not only to DDT and other chlorinated hydrocarbons, such as gamma-BHC, as demonstrated in

TABLE 3b.

Chloroacetates, S in closed disches; T = 30°C.

COMPOUND	Rate g/sq. m.	No. of Larvae employed	Mean Percentage of: Dead Larvae	Sclerotinized Larvae	Partly pupated Larvae	Abnormal Pupae	Pupae of normal appearance	Adults' Emergence calculated on Larvae
Decyl chloroacetate . . .	1.0	2 × 50	69.0	—	—	8.0	**23.0**	7.0
Lauryl chloroacetate . . .	1.0	2 × 50	22.0	4.0	—	26.0	**48.0**	16.0
Myristyl chloroacetate . . .	1.0	1 × 50	2 0	—	—	2.0	**96.0**	82.0
Cetyl chloroacetate. . . .	1.0	1 × 50	—	—	—	4.0	**96.0**	86.0
Stearyl chloroacetate . . .	1.0	2 × 50	—	—	—	1.0	**99.0**	81.0
Gamma-BHC	1.0	2 × 50	—	—	4.2	87.1 (1)	**8.7**	8.7
Control		2 × 50	—	—	—	2.0	**98.0**	90.0
Decyl chloroacetate . . .	0.5	2 × 50	—	—	—	4.9	**95.1**	61.2
Lauryl chloroacetate . . .	0.5	2 × 50	—	—	—	4.0	**96.0**	64.0
Myristyl chloroacetate . . .	0.5	2 × 50	—	—	—	—	**100**	77.6
Cetyl chloroacetate. . . .	0.5	1 × 50	—	—	—	—	**100**	82.0
Stearyl chloroacetate . . .	0.5	1 × 50	—	—	—	2.0	**98.0**	80.0
Gamma-BHC	0.5	1 × 50	—	—	—	88.0 (1)	**12.0**	12.0
Gamma-BHC	0.1	1 × 50	—	—	—	74.0 (2)	**26.0**	14.0
Control		1 × 50	—	—	—	—	**100**	96.0

(1) « gamma-BHC pupae »; (2) 70% « gamma-BHC pupae », 4% other abnormal pupae.

the present work, but also to pyrethrins, diazinon etc. (KOCHER *et. al.* 1953).

As to the chloroacetates, only the first two of the series, decyl and lauryl chloroacetate, have any appreciable toxicity at the 1.0 g/sq. m. level. In the K strain, maximum activity is obtained for lauryl chloroacetate. In the S strain, interestingly enough, decyl chloroacetate acts much better than lauryl chloroacetate at the 1.0 g/sq. m. level; there is thus a steady fall in activity in ascending the alkyl chloroacetate series, for this strain. Moreover, lauryl chloroacetate is much less active against the S strain than against the K strain. It is rather hard to advance an explanation for this anomaly. It may be due to the fact that for the S strain the alkyl chloroacetates act purely as

TABLE 4a.

Chloroacetates, K_1 in open dishes; T = 30°C.

COMPOUND	Rate g/sq. m.	No. of Larvae employed	Mean Percentage of: Dead Larvae	Sclerotinized Larvae	Partly pupated Larvae	Abnormal Pupae	Pupae of normal appearance	Adults' Emergence calculated on Larvae
Decyl chloroacetate . . .	1.0	3 × 50	23.3	7.3	1.3	23.8	**44.3**	41.0
Lauryl chloroacetate . . .	1.0	2 × 50	64.4	8.0	6.8	15.8	**5.0**	0
Myristyl chloroacetate . . .	1.0	2 × 50	9.0	—	—	11.0	**80.0**	58.0
Cetyl chloroacetate. . . .	1.0	2 × 50	3.1	—	1.0	—	**95.9**	78.0
Stearyl chloroacetate . . .	1.0	2 × 50	—	—	—	1.1	**98.9**	90.8
Gamma-BHC	1.0	1 × 50	36.0	—	—	56.0 (¹)	**8.0**	8.0
Control		2 × 50	—	—	—	—	**100**	94.0
Decyl chloroacetate . . .	0.5	2 × 50	2.0	—	1.0	5.0	**92.0**	74.0
Lauryl chloroacetate . . .	0.5	2 × 50	8.4	—	—	14.0	**77.6**	53.0
Myristyl chloroacetate . . .	0.5	2 × 50	2.6	—	—	4.7	**92.7**	85.6
Cetyl chloroacetate. . . .	0.5	2 × 50	—	—	—	—	**100**	92.0
Stearyl chloroacetate . . .	0.5	2 × 50	—	—	—	2.0	**98.0**	96.0
Gamma-BHC	0.5	1 × 50	20.0	—	—	62.0 (¹)	**18.0**	18.0
Control		1 × 50	2.0	—	—	—	**98.0**	92.0

(1) « gamma-BHC pupae ».

fumigants, decreasing in activity with falling vapour pressure, i. e. ascending molecular weight. The K_1 strain, perhaps due to different lipoid composition and a higher lipoid content (WIESMANN and REIFF 1956) may be unable to desorb lauryl chloroacetate. We may attempt to visualize this as follows: Following the argumentation of BRADBURY (1957), volatile insecticides may be absorbed from the vapor phase through the insect cuticle, a process which can be reversed, when the insect leaves the treated surface and bathes itself in clean air. In our experimental procedure, an equilibrium only will be established between absorption and desorption in decyl and lauryl chloroacetate. It is well conceivable that the different lipoid composition of the K_1 strain brings about preferential retention, and disturbances in the desorption of lauryl chloroacetate, which do not occur in the S strain. In larvae of the K_1 strain, lauryl

Table 4b.

Chloroacetates, S in open disches; T = 30° C.

COMPOUND	Rate g/sq. m.	No. of Larvae employed	Mean Percentage of: Dead Larvae	Sclerotinized Larvae	Partly pupated Larvae	Abnormal Pupae	Pupae of normal appearance	Adults' Emergence calculated on Larvae
Decyl chloroacetate	1.0	2 × 50	46.6	—	—	13.1	**40.3**	8.0
Lauryl chloroacetate	1.0	2 × 50	14.0	—	4.0	16.0	**66.0**	40.0
Myristyl chloroacetate	1.0	2 × 50	4.0	—	—	—	**96.0**	76.0
Cetyl chloroacetate	1.0	2 × 50	—	—	—	2.2	**97.8**	89.2
Stearyl chloroacetate	1.0	2 × 50	2.0	—	—	2.0	**96.0**	66.8
Gamma-BHC	1.0	1 × 50	6.0	—	—	87.9 (1)	**6.1**	6.1
Control		2 × 50	—	—	—	1.0	**99.0**	74.5
Decyl chloroacetate	0.5	2 × 50	—	—	—	1.0	**99.0**	80.0
Lauryl chloroacetate	0.5	2 × 50	2.5	—	—	—	**97.5**	78.1
Myristyl chloroacetate	0.5	2 × 50	—	—	—	—	**100**	86.0
Cetyl chloroacetate	0.5	2 × 50	—	—	—	—	**100**	92.0
Stearyl chloroacetate	0.5	2 × 50	—	—	—	2.0	**96.0**	84.0
Gamma-BHC	0.5	2 × 50	—	—	—	82.0 (1)	**18.0**	6.0
Gamma-BHC	0.1	2 × 50	—	—	—	62.0 (2)	**38.0**	28.0

(1) « gamma-BHC pupae »; (2) 58% « gamma-BHC pupae », 4% other abnormal pupae.

chloroacetate « loses » thus its fumigant character and acquires the properties of a « pseudo contact - poison ». (*)

It is evident from Tables 1a, 1b, 2a, 2b, that for the active members of the bromoacetate series, the appearance of normally looking pupae does not ensure normal (85 - 100%) rates of emergence of adults. A similar effect exists for decyl and lauryl chloroacetate and the S strain, and for lauryl chloroacetate and the K_1 strain. For gamma-BHC, on the other hand, pupae of normal ap pearance ensure a good emergence expectancy (up to 100%).

(*) Only by comparing the contact toxicity of lauryl chloroacetate towards larvae of several resistant and several normal strains of houseflies, the possibility that this is a case of « enhanced susceptibility » in resistant housefly larvae can be admitted or excluded.

There is, in general, no marked difference between open and closed dishes for the alkyl bromoacetates, which means, that vapour phase action does not play an important rôle in this series. In the active chloroacetates, both the decyl and lauryl derivative, in consequence of their fumigant properties, have a weaker action on the S strain in the *open* dishes. For the K strain, in accordance with the above considerations, only decyl chloroacetate acts as fumigant, with reduced action in open dishes, while no such reduction occurs for

TABLE 5.

Lauryl Bromoacetate, K_1 in closed and in open dishes; $T = 30°C$.

COMPOUND	Rate, g/sq. m.	No. of Larvae employed	Mean Percentage of: Dead Larvae	Sclerotinized Larvae	Partly pupated Larvae	Abnormal Pupae	Pupae of normal appearance	Adults' Emergence calculated on Larvae	Total Larval and Pupal Mortality: Uncorrected	Corrected
Lauryl bromoacetate *closed* . .	0.5	1 × 50	96.0	—	4.0	—	**0**	0	100	
	0.45	2 × 50	47.0	2.0	6.0	34.0	**11.0**	6.0	94.0	**93.5**
	0.4	2 × 50	23.9	—	8.5	42.0	**25.6**	18.5	81.5	**80.5**
	0.35	2 × 50	20.0	—	—	40.0	**40.0**	30.0	70.0	**68**
	0.3	2 × 50	19 0	—	3.0	22.0	**56.0**	49.0	51.0	**48**
	0.25	3 × 50	8.2	—	1.0	13.0	**77.8**	72.6	27.4	**23**
	0.2	2 × 50	—	—	—	—	**100**	89.7	10.3	**3.3**
	0.15	2 × 50	—	—	—	—	**100**	94.0	6.0	—
Control		2 × 50	—	—	—	—	**100**	94.2	5.8	—
Lauryl bromoacetate *open* . .	0.5	1 × 50	92.2	—	2.0	3.8	**2.0**	0	100	
	0.45	2 × 50	52.0	—	4.0	30.0	**10.0**	6.0	94.0	**93.5**
	0.4	2 × 50	31.0	—	—	46.0	**23.0**	22.0	78.0	**76**
	0.35	2 × 50	30.8	—	—	23.2	**46.0**	41.0	59.0	**55**
	0.3	2 × 50	11.7	—	—	22 8	**65.5**	58.8	41.2	**35**
	0.25	2 × 50	—	—	—	12.2	**87.8**	77.6	22.4	**14**
	0.2	2 × 50	2.0	—	—	—	**98.0**	90.0	10.0	—
Control		2 × 50	2.0	—	—	—	**98.0**	90.0	10.0	—

TABLE 6.

Gamma-BHC, K_1 in closed and in open dishes; $T = 30°C$.

COMPOUND	Rate, g/sq. m.	No. of Larvae employed	Mean Percentage of: Dead Larvae	Sclerotinized Larvae	Partly pupated Larvae	Abnormal Pupae	Pupae of normal appearance	Adults' Emergence calculated on Larvae	Total Larval and Pupal Mortality: Uncorrected	Corrected
Gamma-BHC *closed*	1.0	2 × 50	22.0	—	—	66.0	**12.0**	12.0	88.0	**86**
	0.5	2 × 50	28.7	—	—	55.0	**16.3**	16.3	83.7	**81**
	0.2	2 × 50	21.6	—	—	51.0	**27.4**	25.5	74.5	**70**
	0.1	2 × 50	16.0	—	—	52.0	**32.0**	32.0	68.0	**64**
	0.025	2 × 50	13.3	—	—	40.3	**45.4**	45.4	54.6	**46**
	0.01	2 × 50	9.6	—	—	29.0	**61.4**	57.4	42.6	**34**
	0.005	2 × 50	2.0	—	—	11.8	**86.2**	84.2	15.8	**3.8**
Control		2 × 50	1.0	—	—	2.0	**97.0**	87.0	13.0	—
Gamma-BHC *open* .	0.1	1 × 50	36.0	—	—	56.0	**8.0**	8.0	92.0	**90**
	0.5	2 × 50	34.0	—	—	50.0	**16.0**	16.0	84.0	**80**
	0.2	2 × 50	35.5	—	—	37.5	**27.0**	22.9	77.1	**71**
	0.1	2 × 50	30.4	—	—	17.6	**52.0**	52.0	48.0	**34**
	0.05	2 × 50	12.0	—	—	18.8	**69.2**	60.5	39.5	**23**
	0.025	2 × 50	8.0	—	—	12.0	**80.0**	64.0	36.0	**18**
	0.01	2 × 50	4.1	—	—	8.0	**87.9**	83.4	16.6	—
Control		2 × 50	4.0	—	—	3.0	**93.0**	79.0	21.0	—

lauryl chloroacetate. For gamma-BHC, which has mainly or perhaps solely a vapour phase action, the activity in open dishes should be less. This however cannot yet be discerned in the 1.0 g/sq. m. concentration, in which the vapour concentration at the layer adjacent to the treated surface (i. e. where the larva crawls about) may be as high as in closed dishes (see results in Tables 1a - 4a, 1b - 4b). At the 0.5 g/sq. m. concentration, the effect is discernible in some experiments with the K_1 strain, which possesses a cross resistance to gamma-BHC and thus will react less to the slightly lower vapour concentration in

open dishes. In the S strain, on the other hand, no difference could be seen in results between open and closed dishes at 1.0, 0.5 and even 0.1 g/sq. m. This problem will be treated later on in this paper.

At the 0.5 g/sq. m. level, stearyl bromoacetate was always somewhat more active (as evidenced by the rate of emergence) than cetyl bromoacetate. It was thus suspected, that in addition to the observed maximum at the lauryl compound, there may be another peak at or near the stearyl derivative. Stearyl bromoacetate is inactive against adult flies and of relatively low activity against larvae; this may be due to its too high molecular weight. There is no evidence at all of a second peak for stearyl chloroacetate. This, however, does not preclude the possible existance of such a second peak in the chloroacetate series for the adult stage of the housefly, or other insects.

Of quite compelling interest are the experiments (Tables 5 and 6, Figures 1 and 2) in which log dosage-probit lines were drawn for gamma-BHC and the most active bromoacetate, namely lauryl bromoacetate, when tested at adequate concentrations with the K_1 strain. The ld-p-line for lauryl bromoacetate is unusually steep. It intersects with that for gamma-BHC in both open and closed tests. However, while for lauryl bromoacetate the ld-p-lines in open and closed dishes are completely identical, there is quite understandably a marked difference in the slope for gamma-BHC in open and closed tests, due to differences in gaseous concentrations.

A steep slope was also found for all the bromoacetates tested against adult flies (Ascher 1956, unpublished data) either by tarsal contact of short duration (10 minutes, Ascher 1957a), or by topical application [1]. The bromoacetates, therefore, will render selection and hence also the development of resistance difficult. It was Martin (1950), who first suggested research on compounds having this property. Indeed, the compounds reported as failing to produce resistance in the housefly, or at least as offering serious difficulties in the attempt to build up resistance as e. g. chloroacetic acid (Bettini and Boccacci 1956) and S-17 (phenyl-N, N-dimethylcarbamate, Meltzer 1956), exhibit the steep slope, while substances which allow a quicker built-up of resistance such as e. g. the chlorinated hydrocarbons, have a flatter slope.

Substances characterized by a single pattern of action — such as inhibition of TPD in the case of chloroacetic and iodoacetic acids (Bettini and Boccacci 1954, 1955, 1956a), or (most probably) inhibition of cholinesterase in the case of S-17 (Meltzer 1956) — exhibit the steep slope, while substances acting concurrently on several enzyme systems appear to possess flatter slopes and

---

(1) In contradistinction to results obtained with *continuous* tarsal contact methods, LD_{50}'s calculated from 24-hours' mortality after tarsal contact of *short* duration indicated, that the enhanced susceptibility of resistant strains towards esters of bromoacetic acid cannot be demonstrated by tarsal contact of short duration (for an explanation, see Ascher 1958).

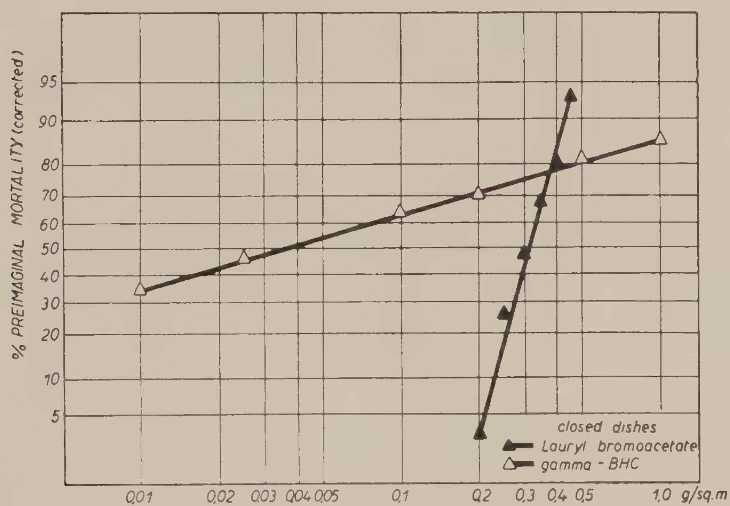


Fig. 1 — All-over preimaginal mortality, K_1 in *closed* dishes.

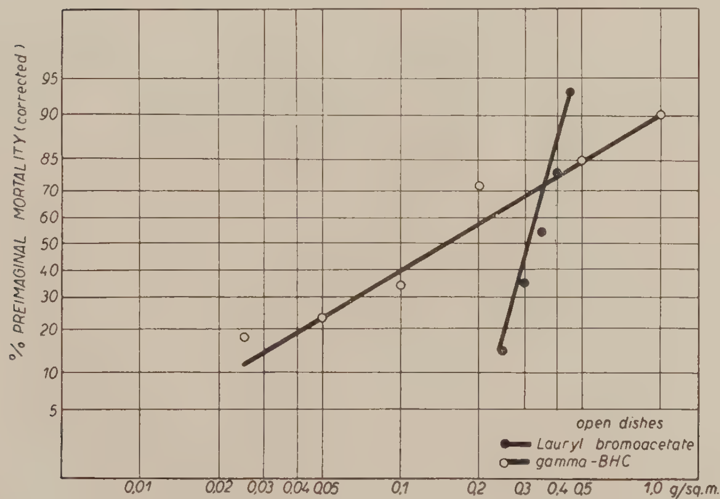


Fig. 2 — All-over preimaginal mortality, K_1 in *open* dishes.

consequently better adaptability to selection and resistance. The organophosphates represent an intermediate case: They act by the inhibition of CHE's, but various other enzymes play a rôle of varying importance in insect poisoning by organophosphates (see e. g. the reviews on this subject by KEARNS 1956, FUKUTO 1957).

Acknowledgement: My thanks are due to Prof. E. D. BERGMANN, in whose laboratories at the Department of Organic Chemistry at the Hebrew University, Jerusalem, a great part of the compounds used in this study were prepared and who has kindly advised me in the preparation of the manuscript. I am also most grateful to Dr. S. BETTINI for many a helpful advice and discussion and for his critical perusal of the paper. Though there are some points in this paper, about which we could not see eye to eye, the criticism advanced by him and by M. BOCCACCI has been of great value to me. The latter has also been most helpful in kindly preparing the majority of the chloroacetates used in this study. The J. R. Geigy, S. A., Basle, has kindly put at my disposal in Rome the K_1 strain of houseflies, already used in the earlier studies in Israel. Finally, I am indebted to the Direzione Generale delle Relazione culturali con l'Estero, Rome, for a research scholarship.

SUMMARY

The contact toxicity of some alkyl (decyl, lauryl, myristyl, cetyl and stearyl) bromoacetates and chloroacetates against prepupating larvae of a resistant and a normal strain of *Musca domestica* L. has been investigated and compared with the effect of gamma-BHC.

RIASSUNTO

E' stata indagata, e messa a confronto con gli effetti del gamma-BHC, la tossicità per contatto di alcuni alchil (decil, lauril, miristil, cetil e stearil) bromoacetati e cloroacetati su larve prepupali di un ceppo resistente e di un ceppo normale di *Musca domestica* L.

BIBLIOGRAPHY

ASCHER K. R. S. (1957): *Riv. Parassit. 18*, 185.

ASCHER K. R. S. (1957a): *Riv. Parassit. 18*, 113.

ASCHER K. R. S. (1958): *Bull. Wld Hlth Org.* (in press).

ASCHER K. R. S. and LEVINSON Z. H. (1954): *Riv. Parassit. 15*, 57. - (Part. III)

BETTINI S. and BOCCACCI M. (1954): *Rend. Ist. Sup. Sanità 17*, 188.

BETTINI S. and BOCCACCI M. (1955): *Experientia 11*, 70.

BETTINI S. and BOCCACCI M. (1956): Communication at the Tenth International Congress of Entomology, Montreal, August 1956.

BETTINI S. and BOCCACCI M. (1956a): *J. Econ. Ent. 49*, 554.

BOUSQUET E. W., SALZBERG P. L. and DIETZ H. F. (1935): *Ind. Eng. Chem. 27*, 1342.

BRADBURY F. R. (1957): *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 51*, 35.

BROWN A. W. A. (1951): « Insect control by Chemicals », New York, John Wiley and Sons, 1951.

BROWN A. W. A., ROBINSON D. W. B. and WENNER B. J. (1948): *Can. J. Res. (D) 26*, 177.

BUSVINE J. R. (1945): *Bull. Ent. Res. 36*, 23.

DILLS L. E. and MENUSAN H. (1935): *Contr. Boyce Thompson Inst.* 7, 63.

FUKUTO T. R. (1957): « The chemistry and action of organic phosphorus insecticides » in METCALF R. L. (editor) « Advances in Pest Control », Interscience Publishers Inc., New York, 1957.

KEARNS C. W. (1956): « The mode of action of insecticides » in Annual Review of Entomology, Vol. I, Annual Reviews Inc., Stanford, California, U.S.A., 1956.

KENAGA E. E. (1950): *J. Econ. Ent. 43*, 938.

KOCHER C., ROTH W. and TREBOUX J. (1953): *Anz. Schädlingsk. 26*, 65.

LEVINSON Z. H. and ASCHER K.R.S. (1954): *Riv. Parassit. 15*, 111.

MARTIN H. (1946): *J. Soc. Chem. Ind.* (Lond.) *65*, 402.

MARTIN H. (1948): *Research 1*, 640.

MARTIN H. (1950): *Rept. Ent. Soc. Ontario 81*, 46.

MELTZER J. (1956): *Med. Landb. & Opzoekingstat., Staat de Gent 21*, 459.

MURPHY D. F. and PEET C. H. (1932): *J. Econ. Ent. 25*, 123.

MURPHY D. F. and PEET C. H. (1933): *Ind. Eng. Chem. 25*, 638.

RIEMSCHNEIDER R. (1956): *Zeitschr. ang. Ent. 38*, 105. (In this paper there are also cited numerous other contributions by the same author on this subject).

SIEGLER E. H. and POPENOE C. H. (1925): *J. Econ. Ent. 18*, 292.

WIESMANN R. and. REIFF M. (1956): *Verh. Naturf. Ges. Basel, 67*, 311.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 2 Aprile 1958

NOTE E OSSERVAZIONI

REPERTO DI *CHILODON DENTATUS* (O *CHILODONELLA DENTATA* - STRAND) IN FECI UMANE

In occasione dell'esame microscopico a fresco di feci emesse a seguito di purgante salino è occorso alla nostra osservazione, in due epoche diverse (30-2-53 e 23-2-54), il reperto di parassitosi sostenute da *Chilodon dentatus* o *Chilodonella dentata* (secondo STRAND), infusorio di forma sub-ovalare, con faccia dorsale convessa e faccia ventrale piatta, normalmente adattato a vita saprofitaria in ambienti poveri di ossigeno, ricchi di materiale organico in decomposizione.

Trattavasi in entrambi i casi di pazienti affetti da colite cronica, che erano stati inviati al nostro laboratorio per la ricerca di *E. histolytica.*

I *Chilodon* riscontrati erano particolarmente abbondanti, e, dato che l'esame era stato eseguito all'atto della emissione della seconda scarica fecale, indubbiamente il cigliato proveniva dall'intestino del soggetto e non da una contaminazione del recipiente utilizzato per la raccolta del materiale fecale.

Precisiamo questo perchè CRAIG e FAUST (1951) sostengono che la presenza di *Chilodon dentatus* nel materiale fecale può essere dovuta a contaminazione da parte dell'acqua con la quale è stato sciacquato il recipiente destinato alla raccolta delle feci, ma vogliamo ricordare d'altra parte che GUIART (citato da BRUMPT, 1936) ne dimostrò la reale presenza in feci raccolte asetticamente.

Quanto al nostro reperto, anche se le feci non furono raccolte in condizioni di sterilità, crediamo non possano sussistere dubbi sulla reale presenza di *Chilodon* nei soggetti esaminati.

Infatti il numero degli infusori era talmente grande da escludere la possibilità di una rapida moltiplicazione di pochi elementi fortuitamente capitati nel materiale fecale, tanto più che di norma le feci da purga vengono osservate microscopicamente all'atto della loro emissione, onde evitare che i protozoi, eventualmente presenti, vadano incontro a fenomeni di degenerazione, tali da ostacolare la diagnosi.

Purtroppo i soggetti che albergavano *Chilodon dentatus* non sono tornati alla nostra osservazione, per cui non possiamo affermare con sicurezza se si trattasse di un vero parassitismo o di un reperto accidentale, dovuto ad ingestione di alimenti contaminati. Malgrado quindi non ci sia possibile definire l'eventuale azione nociva esplicata da *Chilodon dentatus*, abbiamo ritenuto interessante segnalare il reperto data la sua rarità.

M. L. RICCIARDI e G. BARGHINI

Istituto di Igiene «A. Di Vestea» dell'Università di Pisa - Centro per la lotta contro le parassitosi intestinali. (Direttore: Prof. G. BUONOMINI).

BIBLIOGRAFIA

BRUMPT E. (1946): *Précis de Parasitologie* - Masson Ed., Paris.
CRAIG C. F. & FAUST E. C. (1957): *Clinical Parasitology.* Lea & Febiger, Philadelphia.

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELL'AZIONE FARMACOLOGICA DEL VELENO DI *LATRODECTUS TREDECIMGUTTATUS* ROSSI

Il veleno di *Latrodectus* che causa la nota sindrome del «latrodectismo», è stato già oggetto di studio in varie parti del mondo e, specialmente in questi ultimi anni, in Italia dove vive il *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi. (1, 2, 3, 4, 5, 11).

Le caratteristiche fisico chimiche del veleno, come pure la sintomatologia provocata dal morso del ragno, sono pressoché eguali per tutte le diverse specie di *Latrodectus*. Pertanto ho ritenuto utile studiare le proprietà farmacologiche del veleno di *L. tredecimguttatus* su preparati di muscolo striato e liscio in vitro, allo scopo di stabilire eventuali analogie con altri veleni o sostanze e di chiarire alcuni quesiti sul latrodectismo clinico.

1) *Intestino*: le prove sono state eseguite con ileo di coniglio isolato e sospeso in Tyrode con glucosio all'1:1000 secondo Magnus. Aggiungendo al bagno l'omogenato di ghiandole secche in modo da avere una concentrazione finale di mg 0,5/1, si provoca una reazione caratteristica e costante da parte dell'intestino isolato, come dimostra il grafico della figura 1. Dopo circa 30 secondi dall'aggiunta al bagno del veleno si nota un aumento progressivo di tono, senza che le escursioni spontanee vengano a diminuire. Questo aumento permane immutato per lunghi periodi e solo con ripetuti lavaggi in Tyrode si riesce a far ritornare il tono a livello normale. Ripetute somministrazioni di veleno nella stessa quantità, provocano una più o meno progressiva, ma costante attenuazione della risposta, tanto che dopo 3-6 trattamenti, specialmente se molto ravvicinati, l'intestino non risponde più, anche se rimane normale il suo tono e invariata la risposta alla somministrazione di acetilcolina.

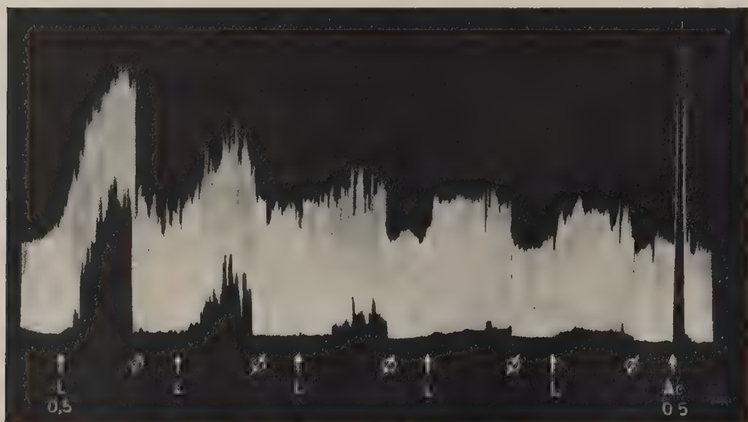


Fig. 1 — Attività spontanea dell'intestino isolato di coniglio e risposta alla somministrazione di veleno di *L. tredecimguttatus* e di acetilcolina.

Al punto ( ) il chimografo di ferma per 15 minuti ed il Tyrode viene rinnovato.

L. : aggiunta al bagno di 0,5 mg/l di omogenato di ghiandole.

Ac.: aggiunta al bagno di 0,5 mg/l di acetilcolina.

L'atropina, alla dose di 0,01 mg/l non riesce ad avere, come risulta dal grafico della figura 2, un'azione antagonista completa verso l'azione del veleno sull'intestino.

2) *Utero*: Ho usato utero di coniglia isolato in Tyrode con glucosio all'1:1000 secondo Magnus. Queste prove hanno messo in evidenza che l'omogenato di ghiandole di *L. tredecimguttatus* aggiunto al bagno non provoca, anche a dosi elevate (2mg/l), un aumento del tono o variazioni delle contrazioni spontanee. Le corna dell'utero, anche



Fig. 2 — Antagonismo dell'atropina sul potere contratturante del veleno di *L. tredecimguttatus* negli intestini isolati di coniglio.

Al punto (/) il chimografo si ferma per 15 minuti ed il Tyrode viene rinnovato.

L. : aggiunta al bagno di 0,05 mg/l di omogenato di ghiandole.

At.: aggiunta al bagno di 0,01 mg/l di atropina.

dopo ripetute somministrazioni di veleno, rimangono sensibili all'aggiunta al bagno di piccole quantità di adrenalina (0,1 mg/l).

3) *Diaframma*: per saggiare l'effetto del veleno sul diaframma isolato e stimolato elettricamente, ho usato un preparato frenico-diaframma secondo Bottazzi e Bulbring, che normalmente viene allestito per mettere in evidenza l'azione curarizzante di alcune sostanze. Il muscolo diaframma viene messo in una soluzione di Tyrode modificata da Fleckenstein a 30°C, con ossigeno gorgogliante. Il nervo riceve 2 sti-

moli al minuto della durata di 0,2 millisecondi con intensità di 0,2-0,3 milliampères ciascuno.

Da questa serie di esperienze ho potuto rilevare che basse concentrazioni di ghiandole aggiunte al bagno, non modificano le contrazioni muscolari in seguito alla stimolazione elettrica del nervo, ma se la concentrazione del veleno supera 2 mg/l, si nota una diminuzione progressiva dell'ampiezza della concentrazione muscolare nè ripetuti lavaggi riportano la contrazione alla primitiva ampiezza.

DISCUSSIONE.

Il veleno di *L. tredecimguttatus* ha mostrato una spiccata azione contratturante sugli intestini; il carattere progressivo e la relativa lentezza con cui si stabilisce la contrazione, e la mancanza di una vera azione antagonista da parte dell'atropina, permetterebbe di ravvicinare l'effetto del veleno a quello delle numerose sostanze descritte sotto il nome di « slow reacting substances »: substance P (8), Kallidin (13), Bradjkinin (12); a queste sostanze è stato spesso attribuita una natura polipeptidica (10).

Questa spiccata azione contratturante sugli intestini, che si manifesta anche a basse concentrazioni di veleno, potrebbe costituire un metodo sensibile di dosaggio biologico dell'attività del veleno, e di controllo delle varie frazioni del veleno dopo elettroforesi.

La mancanza del potere contratturante da parte del veleno sull'utero isolato, è in apparente contrasto con quanto ho frequentemente osservato durante le prove di tossicità sul ratto e sulla cavia. Infatti, inoculando il veleno a ratti e cavie in stato di gravidanza avanzata, ho assistito quasi costantemente all'espulsione del feto. Questa azione abortiva da parte del veleno sembra quindi dovuta più che ad un'azione oxitocica, ad un'azione tossica generale.

Con il preparato frenico diaframma è stato messo in evidenza che il veleno ha un'azione tossica sulle placche neuro muscolari; inoltre questo effetto inibitore delle contrazioni muscolari, a differenza dei curari comunemente usati (tubocurarina, succinilcolina, flexadil), è irreversibile.

G. P. CANTORE
Istituto Superiore di Sanità, Roma.

BIBLIOGRAFIA

1) BETTINI S. (1954): *Rend. Ist. Sup. San. 17*, 33.
2) BETTINI S., ANTONINI E. e CANTORE G. P. (1953): *Arch. It. Sc. Med. Trop. Parass. 34*, 579.
3) BETTINI S. e CALCARA S., (1956): *Riv. Parass. 17*, 186.
4) BETTINI S. e CANTORE G. P. (1953): *Arch. It. Sc. Med. Trop. Parass. 34*, 136.
5) BETTINI S. e CANTORE G. P. (1955): *Rend. Ist. Sup. San. 18*, 488.
6) BOTTAZZI F. (1914): *R. C. Reale Acc. Lincei 10*, 12.
7) BULBRING E. (1946): *Brit. J. Pharmacol. 1*, 38.
8) EULER U. S. e GADDUM I. H., (1930): *J. Phisiol. 72*, 74.
9) FLECKENSTEIN A. e TANGNER R. (1950): *Arch. Exp. Path. Pharm. 209*, 286.
10) GADDUM J. H. (1955): Polipeptides, Livingstone LTD, Edinburgh and London.
11) RAVAIOLI L., CANTORE G. P. e BETTINI S. (1957): *Riv. Parass. 18*, 3.
12) ROCHA G., SILVA M., BERALDO W. T. e ROSENFELD G. (1949): *Amer. J. Phisiol. 156*, 261.
13) WERLE E. (1937): *Biochem. Z. 289*, 217.

Direttore responsabile: Dott. E. MOSNA

Soc. An. Poligrafica Italiana Roma, Via della Guardiola, 22

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 3 Luglio 1958

STUDI SU *ENTAMOEBA MOSHKOVSKII*

II. *ENTAMOEBA MOSHKOVSKII* TSHALAIA, 1941, COME POTENZIALE PARASSITA: SUA SOPRAVVIVENZA NELLE INFEZIONI SPERIMENTALI INTRAEPATICHE DELL'HAMSTER E ENDOCIECALI DEL RATTO ALBINO.

IVO DE CARNERI (*)

Numerosi episodi epidemici, tra i quali particolarmente noto è quello di Chicago nel 1933, hanno messo in evidenza che l'inquinamento dell'acqua con cisti di *Entamoeba histolytica* è uno dei principali modi di diffusione dell'amebiasi. Tuttavia il ritrovamento delle caratteristiche cisti tetranucleate non è sufficiente per far giudicare un'acqua come inquinata da *E. histolytica,* dopo che TSHALAIA, nel 1941, isolò in impianti annessi alle fognature di Mosca una nuova specie di *Entamoeba,* che fu denominata *E. moshkovskii.* Le sue cisti, i suoi trofozoiti e i processi di incistazione ed excistazione sono indistinguibili da quelli di altre specie che conducono vita parassitaria quali *E. aulastomi, E. ranarum, E. invadens* ed *E. histolytica.* Anche la sua sensibilità a numerosi farmaci è abbastanza simile; ben maggiore invece è la capacità dei suoi trofozoiti di svilupparsi o almeno di sopravvivere a temperature assai varie (DE CARNERI 1957, 1958 c. d.). Questa caratteristica è dovuta al fatto che, a differenza delle altre specie sopracitate, *E. moshkovskii* conduce vita libera ed è continuamente soggetta alle variazioni di temperatura dell'ambiente esterno. Questo protozoo è stato in seguito isolato in varie parti del mondo da fanghi raccolti in impianti di sedimentazione di acque di scarico. NEAL (1953) mette in evidenza che questi fanghi sono destinati ad essere essicati; durante tale processo la maggioranza delle cisti muore e la specie non può per questa via propagarsi altrove. Questa localizzazione di *E. moshkovskii* è perciò da considerarsi secondaria. TSHALAIA (1947) ha in un secondo tempo isolato protozoi di

---

(*) *Istituto d'Igiene e Microbiologia, Università di Pavia* e *Istituto Carlo Erba per Ricerche Terapeutiche, Labor. di Microbiologia.* (Direttore: Prof. L. CHECCACCI).

questo tipo anche da due stagni a Mosca e da un fiume a Minsk; NEAL tuttavia, avendo constatato che i ceppi londinesi di *E. moshkovskii* crescono solo in anaerobiosi e non sopravvivono in acqua o in soluzioni fortemente ipotoniche, dubita che quei protozoi appartengano alla stessa specie. Quest'ultimo autore ha d'altro canto osservato che cisti di *E. moshkovskii* di provenienza ignota arrivano continuamente negli impianti di sedimentazione.

In base a queste osservazioni è sorto naturalmente il problema se *E. moshkovskii* non rappresenti una fase a vita libera di qualche *Entamoeba* parassita. TSHALAIA (1947) e NEAL (1953) hanno dimostrato che questo protozoo non attecchisce nell'intestino dei girini di rana e delle larve di *Salamandra maculosa*. PIZZI (1956) avendo osservato che i trofozoiti in cultura fagocitano globuli rossi di mammiferi, non però di uccelli, considera *E. moshkovskii* come un potenziale parassita dei primi. AZZI-LEAL e AMARÀL (1950) hanno tentato invano di infettare delle cavie. NEAL (1953) ha iniettato dei trofozoiti, coltivati alla temperatura ottimale di 26° C., nel cieco di 10 giovani ratti albini. Due animali su tre avevano delle amebe nel cieco 5 ore dopo l'iniezione e amebe dall'aspetto degenerato, ma ancora vive, erano presenti nel cieco di uno dei due ratti sacrificati dopo 60 ore. Gli altri animali, sacrificati più tardi, erano negativi. Inoltre un ceppo di *E. moshkovskii*, coltivato a 37° per 6 settimane, venne iniettato nel cieco di 6 ratti. Sacrificati parte dopo 2, parte dopo 7 giorni, questi animali risultarono tutti negativi.

E' noto (DE CARNERI, 1958 a) che anche ceppi non virulenti di *E. histolytica* possono incontrare delle difficoltà nello stabilirsi nel lume del cieco dei ratti. Il passaggio nel fegato di hamster aumenta l'infettività, oltre che la virulenza, di questa *Entamoeba*. Ho quindi pensato di osservare l'andamento dell'infezione endociecale dei ratti con culture di *E. moshkovskii* dopo una serie di passaggi nel fegato di *Cricetus auratus*. I metodi usati e i risultati ottenuti sono descritti qui di seguito.

Infezione intraepatica nell'hamster dorato.

Il ceppo di *E. moshkovskii* usato, associato ad una flora batterica mista necessaria alla sua crescita, è di provenienza brasiliana. Nel nostro laboratorio viene mantenuto a 26° C mediante passaggi settimanali in terreno monofasico di Pavlova (1938) composto di estratto di lievito 0,1%, siero di cavallo 5%, tampone di fosfati pH 7,2, NaCl e un po' di polvere di riso. A seconda della quantità di trofozoiti necessaria per l'infezione, si raccolgono i sedimenti di culture incubate per 2 giorni a 26° C in bottiglie di Roux da l. 1, in beute da 250 cc o in provette da 4 cc. La sospensione pronta per essere iniettata deve contenere da 500.000 ad 1.000.000 di amebe e 2-4 miliardi di batteri/cc.

Gli hamster, del peso di circa 50 gr, vengono anestetizzati con etere; si pratica loro una incisione trasversale all'altezza del fegato e si iniettano da 0,05 a 0,1 cc di sospensione amebica contenente 50.000 trofozoiti nella parte

dorsale del lobo epatico destro. Per neutralizzare i batteri associati, circa mezz'ora prima dell'iniezione alla sospensione amebica si aggiungono 1000 U di penicillina G sodica e 1000 μg di diidrostreptomicina solfato per cc. Una eguale quantità dei due antibiotici viene immessa nella cavità peritoneale. L'incisione viene chiusa con graffe « Michel » e gli animali vengono conservati a dieta normale fino al momento in cui vengono sacrificati per osservare l'andamento del l'infezione. A questo scopo gli hamster vengono uccisi con vapori d'etere e il fegato viene asportato. Si isola la parte lesa e vi si ricercano le amebe spappolandola in mortaio con soluzione fisiologica e procedendo ad un attento esame microscopico diretto. Con questo metodo non potei mai, dopo 48 ore o più dall'iniezione, mettere in evidenza amebe nel fegato di nessuno dei trenta hamster infettati. Le lesioni, limitate alla zona danneggiata dall'ago o dovute ai batteri che i suddetti antibiotici non eliminano mai completamente, furono sempre assai piccole, anche dopo 4-5 giorni dall'infezione.

Da ogni lesione furono allestite delle culture in due provette di terreno di Pavlova e in due altre provette contenenti una base di siero di cavallo coagulato a becco di clarino e una fase liquida costituita da terreno di Pavlova in cui al posto del siero di cavallo è presente bianco d'uovo in ragione di uno ogni 250 cc. Una provetta per ogni terreno è posta ad incubare a 26° C; le due rimanenti vengono incubate a 37° C. Due esami microscopici vengono eseguiti dopo 2 e 4 giorni.

Nel fegato di tutti gli hamster infettati si mise in questo modo in evidenza la presenza di batteri e, nel 50% circa dei casi, si ritrovò anche *E. moshkovskii*. La sua presenza diviene sempre meno probabile col passare del tempo dal momento dell'iniezione: i 5 hamster sacrificati 5 o più giorni dopo l'iniezione erano negativi. Seguendo una tecnica vantaggiosamente usata con *E. histolytica* (DE CARNERI, 1958 a, b) si tentò di infettare degli hamster con del materiale prelevato direttamente dalle lesioni epatiche, ma non si ottennero risultati positivi. Evidentemente qualcuna delle 50.000 amebe iniettate sopravvive a stento per 3 - 4 giorni, rivelandosi tuttavia incapace di moltiplicarsi non solo a spese dei tessuti ma anche nutrendosi dei prodotti di disfacimento dei tessuti sottoposti all'azione batterica. E' da notare che i trofozoiti di *E. moshkovskii* in cultura sopravvivono per qualche settimana alla temperatura di 37° C.

Così *E. moshkovskii* si rivela nettamente meno adatta a sopravvivere da saprofita negli ascessi batterici sperimentali di quanto non lo siano *E. gingivalis* e vari flagellati parassiti delle vie digestive dell'uomo (WESTPHAL, 1939).

Da una cultura a 37° C ottenuta a partire dal fegato di uno degli hamster infettati, *E. moshkovskii* venne iniettata nel fegato di altri hamster. Un ramo del ceppo fu così passato alternativamente da culture incubate sempre a 37° C al fegato di nuovi animali, per un totale di 81 giorni a 37° C ed una serie di 8 hamster. La gravità delle lesioni epatiche e la frequenza dei reperti positivi non aumentò col progredire della serie.

Invece i batteri associati divennero virulenti e resistenti ai due antibiotici, provocando delle setticemie che portavano a morte gli hamster entro 24 ore.

Per questo motivo la serie dei passaggi nel fegato fu arrestata all'ottavo animale e questo ramo del ceppo fu usato per infettare il cieco di un gruppo di 35 rattini, secondo le modalità descritte qui di seguito. Per confronto altri 35 rattini furono infettati con il ramo originale del ceppo, conservato a 26° C.

Infezione endociecale nel ratto. La procedura è simile a quella descritta in un precedente lavoro (DE CARNERI, 1958 a). Giovani ratti albini di 24 - 28 gr. vengono tenuti per due giorni a una dieta della seguente formula: farina di mais intero = gr. 330; farina di frumento intero = gr. 310; farina di pressatura di olio di lino = gr. 70; farina di alfalfa = gr. 20; estratto di fegato in polvere = gr. 30; latte intero in polvere = gr. 210; lievito di birra secco = gr. 20; NaCl = gr. 5; $CaCO_3$ = gr. 5.

Come bevanda si somministra una soluzione acquosa al 0,1% di acido ascorbico. Dopo un giorno di digiuno i ratti, anestetizzati con etere, vengono laparatomizzati e si inietta loro nel cieco una sospensione amebica in mucina Wilson 1701-W al 3%. Ogni animale riceve circa 250.000 trofozoiti. Si instillano endoperitoneo 1000 U di penicillina e 1000 μg di diidrostreptomicina, si chiude con graffe «Michel» e si tengono gli animali alla dieta descritta, fino al momento in cui vengono sacrificati per osservare l'andamento dell'infezione. I ratti vengono allora uccisi con vapori d'etere, il cieco viene asportato ed aperto. Si ricercano al microscopio le amebe nel contenuto ciecale diluito con soluzione fisiologica e si allestiscono delle culture nei terreni, alle temperature e con le modalità sopra descritte.

La massa fecale viene quindi accuratamente allontanata dalle pareti del cieco e si osserva l'aspetto della mucosa; questa viene poi asportata con uno scalpello, stemperata con soluzione fisiologica su un vetrino e sottoposta ad indagine microscopica. Nel corso di questo lavoro nessuno dei 70 rattini infettati ha mai mostrato alterazioni macroscopiche o infiltrazioni microscopiche nella parete del cieco. Per quanto riguarda la sopravvivenza di *E. moshkovskii* nel lume ciecale, nella tabella 1 sono riassunti i risultati ottenuti dopo iniezione di trofozoiti del ceppo originario coltivati a 26° C e dopo iniezione in un'altra serie di ratti di trofozoiti coltivati a 37° C, appartenenti al ramo del ceppo passato attraverso il fegato degli hamster.

I 10 ratti delle due serie, sacrificati dopo 8 ore, risultano fortemente positivi anche all'esame diretto. In tempi successivi i ratti della serie infettata con trofozoiti tenuti a 26° C eliminano rapidamente *E. moshkovskii* dall'intestino. Dopo 24 ore l'esame culturale mette in evidenza 4 infezioni su 5 animali, ma le amebe sono tanto rare che solamente 2 ratti su 5 risultano positivi all'esame diretto. Tutti gli animali sacrificati in tempi successivi risultano negativi all'esame diretto: tuttavia la ricerca culturale mette in evidenza 4 in-

fezioni su 5 animali sacrificati dopo 32 ore. Gli appartenenti a quattro gruppi di 5 animali l'uno sacrificati dopo 48, 56, 72, 80 ore risultano negativi sia all'esame diretto sia dopo arricchimento per cultura.

L'altro ramo del ceppo dà delle infezioni alquanto più persistenti. Dopo 24 ore 5 ratti su 5 esaminati risultano positivi anche all'esame diretto e dopo 32 ore su 5 ratti 2 risultano positivi all'esame diretto, mentre l'arricchimento culturale mette in evidenza oltre a questi altri 2 casi positivi: in totale 4 animali infetti su 5. Dopo 48 ore nessun caso positivo si rivela all'esame diretto ma 4 casi su 5 risultano positivi dopo cultura. Con questo metodo si rivelano ancora 2 casi su 5 dopo 56 ore ed 1 su 5 dopo 72 ore. Dopo 80 ore tutti gli animali sono negativi.

TABELLA 1.

Sopravvivenza di E. moshkovskii *nel cieco di giovani ratti albini.*

Ore dalla infezione	Ceppo coltivato a 26 C°			Ceppo coltivato a 37° C per 81 giorni e passato nel fegato di una serie di 8 hamster		
	ratti infettati	casi positivi		ratti infettati	casi positivi	
		esame diretto	cultura e totale (1)		esame diretto	cultura e totale (1)
8	5	5	5	5	5	5
24	5	2	4	5	5	5
32	5	0	5	5	2	4
48	5	0	0	5	0	4
56	5	0	0	5	0	2
72	5	0	0	5	0	1
80	5	0	0	5	0	0

(1) Tutti gli animali positivi all'esame diretto diedero culture positive.

CONCLUSIONE

E. moshkovskii non si rivela adatta a sopravvivere più di 3 o 4 giorni nel fegato di *Cricetus auratus,* animale che si presta più di numerosi altri ad essere parassitato in questa sede da *E. histolytica* (REINERTSON e THOMPSON, 1951). La presenza di piccole lesioni batteriche, entro cui altri protozoi parassiti del tubo digerente dell'uomo e di altri mammiferi possono sopravvivere e moltiplicarsi (vedi anche DE CARNERI, 1958 a), non giova alla sua sopravvivenza.

La carica di *E. moshkovskii* iniettata nel cieco di giovani ratti albini, animali particolarmente recettivi ad *E. histolytica* (Jones, 1946), non provoca alcuna irritazione nelle pareti intestinali e viene progressivamente smaltita con le feci. Con tutta evidenza i 250.000 trofozoiti iniziali non si moltiplicano e divengono perciò sempre più radi; alla sera del giorno successivo all'iniezione solo l'arricchimento culturale permette di metterli in evidenza. Dopo 48 ore tutti i ratti sono negativi.

Un ramo del ceppo tenuto per 81 giorni a 37° C ed allenato a sopravvivere nel corpo di un mammifero mediante una serie di passaggi nel fegato di hamster, dimostra di resistere alquanto più a lungo nell'intestino del ratto. Tuttavia anche in questo caso nessun animale risulta infetto dopo il terzo giorno dalla infezione.

Le nostre prove tendenti a mettere in evidenza la possibilità di adattamento dei trofozoiti di *E. moshkovskii* ad una vita parassitaria in due mammiferi, hamster e ratto, si possono considerare negative, come negativi furono i risultati delle prove di Tshalaia (1941) sui gattini e degli Autori già citati sui ratti e le cavie.

Quando anche fosse dimostrato che i trofozoiti possono moltiplicarsi nel fegato o nel cieco di un mammifero, resterebbe da dimostrare che le cisti ingerite passano inalterate attraverso il suo stomaco e si schiudono nell'intestino, prima di poter affermare che questa entameba è in grado di sopravvivere come parassita intestinale di una determinata specie.

Diminuisce così, seppur di poco, la probabilità che *E. moshkovskii* rappresenti una fase a vita libera di un protozoo parassita.

Ringraziamenti:

Ringrazio la Assistente tecnica Bisogni V. per la collaborazione prestata.

RIASSUNTO

50.000 trofozoiti di un ceppo brasiliano di *E. moshkovskii*, associati ad una flora batterica mista, vennero iniettati nel fegato di una trentina di *Cricetus auratus*. Lo sviluppo dei batteri venne controllato somministrando antibiotici inattivi sulle amebe. Le lesioni epatiche furono sempre assai piccole e di natura batterica. Dopo il secondo giorno dalla infezione sopravvivono nel fegato così pochi protozoi che un arricchimento in adatti terreni di cultura permette di metterli in evidenza solo nel 50% degli animali. Dopo il quinto giorno tutti gli animali esaminati risultarono liberi da queste amebe. I tentativi di infettare degli hamster con materiale prelevato dal fegato di animali infetti non ebbero successo. Un ramo del ceppo fu passato in una serie di hamster alternando le infezioni epatiche a periodi di arricchimento in cultura a 37°C.

Dopo 81 giorni a questa temperatura e 8 passaggi nel fegato, 250.000 trofozoiti furono iniettati nel cieco di 35 rattini tenuti a dieta speciale. Per confronto altri 35 rattini furono infettati con le stesse quantità di trofozoiti del ceppo originario, coltivato a 26°C. In entrambi i gruppi l'infezione andò rapidamente esaurendosi, un po'

più lentamente nel caso delle amebe coltivate a 37°C. di cui qualcuna sopravvisse nell'intestino di un ratto per un massimo di tre giorni.

Si conclude che *E. moshkovskii* non si moltiplica in maniera apprezzabile nel fegato e rispettivamente nell'intestino dei due mammiferi studiati. La durata della vita dei suoi trofozoiti nel fegato di hamster e nell'intestino di ratto è da 5 a 10 volte più breve che non in cultura alla stessa temperatura. *E. moshkovskii* non è in grado di sopravvivere come parassita occasionale, nemmeno nelle nostre condizioni sperimentali, studiatamente favorevoli.

SUMMARY

50.000 trophozoites of a Brazilian strain of *E. moshkovskii* associated with a mixed bacterial flora, were inyected into the livers of about thirty *Cricetus auratus*. Development of the bacteria was controlled by administering antibiotics inactive against the amebae. The hepatic lesions were always extremely small and of a bacterial nature. After the second day of infection such few protozoa survived in the liver that enrichment in suitable culture media revealed them in only 50% of the animals. On the fifthy day, all the animals tested appeared to be free of amebae. Attempts to infect hamsters with material taken from the liver of infected animals was unsuccessful. One branch of the strain was passed in a series of hamsters alternating the hepatic infections with periods of enrichment in cultures at 37°C.

After 81 days at this temperature and 8 liver passages, 250.000 trophozoites were injected into the coecum of 35 young rats kept on a special diet. As controls, further 35 young rats were infected with the same quantity of trophozoites of the original strain cultured at 26°C.

In both groups, the infection rapidly died out, more slowly as regards amebae cultivated at 37°C, of which some survived in the intestine of a rat for a maximum of 3 days.

It is concluded that *E. moshkovskii* does not multiply in any appreciable manner in the liver and respectively in the intestine of the two mammals studied. The duration of life of the trophozoites in the liver of hamsters and the intestine of rats is 5 to 10 times shorter than in cultures at the same temperature. *E. moshkovskii* cannot survive as occasional parasite, not even under our experimental conditions which were deliberately made favourable.

BIBLIOGRAFIA

Azzi Leal R. e Amaral A. D. F. (1950): Novos estudos sôbre amebas encontradas em esgôto, com referência especial a uma endamoeba (*E. moshkovskii*) semelhante à *Endamoeba histolytica*, *Arq. Fac. Hig. Saúde públ. Univ. S. Paulo*, *4*, 125.

de Carneri I. (1957): *Entamoeba invadens* Rohain, 1934, ed *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903; studio comparato della sensibilità in vitro a 16 farmaci, e problemi connessi con l'uso della prima come modello per ricerche di chemioterapia dell'amebiasi, *Riv. di Parass.*, *18*, 133.

de Carneri I. (1958a): Studi sulla virulenza di *Entamoeba histolytica*. I. Variazioni cicliche della virulenza di un ceppo di *Entamoeba histolytica* nell'infezione intestinale del ratto albino in seguito a passaggi seriali in vitro e nel fegato di *Cricetus auratus*, *Riv. di Parass.*, *19*, 7.

DE CARNERI I. (1958b): Studi sulla virulenza di *Entamoeba histolytica*. II. Riacquisto della virulenza verso il ratto albino da parte di due ceppi di *Entamoeba histolytica* dopo lunghi periodi di apparente apatogenicità, *Giorn. Mal. Inf. e Parass.*, in corso di stampa.

DE CARNERI I. (1958c): Studi su *Entamoeba moshkovskii*. I. Velocità d'azione di 16 farmaci sui trofozoiti di *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941, a 3 diverse temperature, *Riv. di Parassitol.*, *19*, 81

DE CARNERI I. (1958d): Spezifität und Geschwindigkeit der Wirkung zweier verschiedener Reihen von Dicloracetamid-Derivaten auf 3 Entamoeba-Arten., *Ztsch .Tropenmed u. Parasitol.*, *9*, 32 .

JONES W. R. (1946): The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica;* with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds.; *Ann. Trop. Med.* *40*, 130.

NEAL R. A. (1953): Studies on the morphology and biology of *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941, *Parasitology*, *43*, 253.

PAVLOVA E. A. (1938): Sur les méthodes de la culture d'*Entamoeba histolytica*, *Med. Parasit. & Parasitic. Dis. Mosca*, 7, 224.

PIZZI T. (1956): Observaciones sobre fagicitosis de eritrocitos par *Endamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941, *Bol. Chileno Parasitol.*, *11*, 7.

REINERTSON J. W., THOMPSON P. E. (1951): Experimental amebic hepatitis in hamsters. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, *76*, 518.

TSHALAIA L. E. (1941): (Su una specie di *Entamoeba* scoperta in acque di scarico) (in russo) *Med Parasit. & Parasitic. Dis.*, Mosca *10*, 224. Riass. in *Trop. Dis. Bull.* 1943, *40*, 311.

TSHALAIA L. E. (1947): (Contributo allo studio di *Entamoeba moshkovskii*) (in russo) *Med. Parasit. & Parasitic Dis.* Mosca, *16*, 66. Riassunto in *Abstr. World Med.* 1948, *4*, 110.

WESTPHAL A. (1939): Protozoen der offenen Körperhöhlen des Menschen in experimentellen Abszessen, *Z. Bakt. Abt. I. Orig.*, *144* 416.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 3 Luglio 1958

STUDI SULLA BIOLOGIA DI E. HISTOLYTICA

III) UTILITA' DEL METODO DI CHANG PER L'INCISTAMENTO *IN VITRO* DI *E. HISTOLITICA* (*)

M. L. RICCIARDI e E. GOZZI (**)

In una precedente nota, uno di noi (Ricciardi 1957) ebbe ad esporre i risultati conseguiti da un esame comparativo dei metod. di Dobell, di Balamuth e di Zuckermann - Meleney per l'ottenimento « in vitro » di cisti di *E. histolytica,* precisando come quest'ultimo fosse il migliore dei tre per la quantità di cisti che permette di realizzare e per il grado di maturazione che esse raggiungono. Pertanto tale metodo era stato adottato nella routine per studiare il comportamento delle cisti in varie condizioni ambientali (Buonomini, Ricciardi e Gozzi 1958)

Data però la indaginosità di preparazione e di uso del terreno di Zuckermann - Meleney e la complessità della sua composizione è stato ritenuto utile riprendere in esame il problema dell'incistamento « in vitro », tenuto altresì conto del fatto che due dei componenti di detto terreno, il « Cerophil » e l'estratto di fegato (Lilly n. 343), sono difficilmente procurabili perchè non si trovano sul mercato italiano.

Alla luce dell'esperienza acquisita abbiamo così ripreso lo studio del metodo di Dobell, che già avevamo esaminato nella precedente ricerca e che ci era apparso di assai facile esecuzione, in comparazione col metodo di Stone e con quello di Chang.

Per queste prove abbiamo utilizzato, come per quelle descritte nella nota precedente, i seguenti stipiti di *E. histolytica*:

1) Ceppo F_{22}, proveniente dai Laboratori del N. I. H. di Bethesda (U. S. A.).

(*) Lavoro eseguito col contributo del C.N.R.

(**) *Istituto di Igiene « A. Di Vestea » della Università di Pisa.* (Direttore: Prof. G. Buonomini).

2) Ceppo VI° di Amburgo, gentilmente inviatoci dal Laboratorio Scientifico della Carlo Erba.

3) Ceppo R, gentilmente inviatoci dal Laboratorio Scientifico della Carlo Erba.

4) Ceppo Lero, isolato da noi in Pisa nel 1954 da un bambino portatore sano.

5) Ceppo Santoni, isolato da noi a Pisa nel 1956 da un bambino affetto da enterocolite acuta.

6) Ceppo Diamantidis, isolato da noi nel 1956 da uno studente universitario di nazionalità greca affetto da colite cronica.

7) Ceppo Cecchetti, da noi isolato nel 1956 da un soggetto adulto affetto da enterocolite acuta.

Prima di passare all'esposizione dei risultati conseguiti in questa ricerca comparativa riportiamo la descrizione schematica dei vari metodi impiegati.

Metodo di Dobell (1926).

Terreno di adattamento: Si usa il terreno di Dobell e Laidlaw modificato da Deschiens. Tale terreno che ha come fase solida dell'uovo coagulato e come fase liquida il terreno di Ringer + siero di cavallo (Ringer-egg-serum, R.E.S.), viene privato gradualmente del suo contenuto in amido di riso fino a coltivare *E. histolytica*, per 1-2 passaggi, in assenza totale di detta sostanza. Subito dopo il ceppo viene trasferito nel *terreno di incistamento*, costituito da liquido di Locke, addizionato di notevole quantità di amido di riso. Incubazione a 37°C per 48h.

Metodo di Stone (1935)

Terreno di adattamento: Si usa terreno (R.E.S.) costituito, come è già stato detto, nella parte solida da uovo coagulato e nella parte liquida da Ringer + siero di cavallo. Dopo incubazione a 37°C per 48h viene rimossa quasi tutta la fase liquida lasciandone solo 1 cc. circa. Con tale residuo si lava tutta la superficie solida del terreno e la sospensione che se ne ottiene viene messa in una provetta sterile assieme a sospensioni simili ottenute da altre 2 o 3 colture, così da avere un inoculo molto ricco di amebe; questo inoculo viene seminato in un unico terreno di incistamento.

Terreno di incistamento: 1) Liquido di Locke: Cloruro di sodio g. 8; Cloruro di calcio g. 0,20; Cloruro di potassio g. 0,20; Cloruro di magnesio g. 0,01; Fosfato bisodico (Na_2HPO_4-$12H_2O$) g. 2; Bicarbonato di sodio g. 0,40; Fosfato monopotassico (KH_2PO_4) g. 0,30; Acqua distillata cc. 1000. Sciogliere le varie sostanze nell'ordine a leggero calore, dopo raffreddamento a t.a., filtrare attraverso carta e distribuire in tubi, in ragione di cc. 10 ciascuno; sterilizzare in autoclave a 120°C per 20'.

2) Fiore di farina di grano: triturare fino al passaggio attraverso un setaccio n. 50 e distribuire in tubi, in ragione di g. 4 ciascuno. Sterilizzare in autoclave a 120°C per 20' ed asciugare in stufa a 58°C per 24h. Prima dell'uso aggiungere al tubo con la soluzione sterile di Locke, mediante pipetta a punta larga, cc. 0,05 del fiore di farina.

Dopo la semina il terreno di incistamento suddescritto, si tiene ad incubare a 37°C: nelle prime 24-36 ore vi è uno sviluppo notevole di trofozoiti; le amebe cominciano quindi ad incistarsi e, tra le 48-72 ore di incubazione, tutti i trofozoiti presenti nella coltura sono incistati.

Metodo di Chang (1942)

Terreno di adattamento: Terreno di Cleveland modificato e terreno di Boeck - Drbohlav, secondo la formula nota.

Per il terreno di Cleveland modificato bollire g. 33 di Bacto-Entamoeba medium della Difco + g. 9 di agar (*) in 1 litro di acqua distillata per pochi minuti. Distribuire ancora a caldo in tubi (15 × 150 mm.) e sterilizzare in autoclave a 120°C per 20'. Lasciare solidificare a becco di clarino e tenere a t.a. per 24-48h per permettere all'agar di ben solidificare. Aggiungere poi a ciascun tubo cc. 4 di una parte liquida così costituita:

Soluzione salino-fosfatata (M/30), tamponata a pH 8,0 : (g. 11,23 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; g. 269 KH_2PO_4; g. 8 NaCl; acqua distillata sino a cc. 1000) e sterilizzata a 120°C per 20'. A 10 parti di detta soluzione aggiungere una parte di siero sterile di cavallo inattivato a 56°C per 30' ed una quantità di amido di riso tale da aversi per ogni tubo (cc. 4) due o tre ansate di riso.

Il terreno, così preparato, viene controllato nel pH (7,1-7,2) e tenuto poi a 37°C per 24h per il controllo di sterilità

Può essere mantenuto in frigorifero per 2-3 mesi.

Gli stipiti di *E. histolytica*, di recente isolamento, vengono prima mantenuti nel terreno di Cleveland modificato per 6-8 settimanane, trapiantando ogni 4-6 giorni, per rendere stabile lo sviluppo dei trofozoiti. Si comincia quindi una serie di trapianti (da colture di 48h di sviluppo) in terreno di Boeck-Drbohlav, eseguendo i passaggi ogni 48h. Dopo 4-5 settimane si passa finalmente nel terreno di incistamento, raccogliendo insieme il sedimento (cc. 0,5) di tre colture di 48h di sviluppo.

Terreno di incistamento: 1) Soluzione salina (0,4%) fosfatata (M/30), tamponata (pH 7,6): sciogliere separatamente g. 11,94 di $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ e g. 4,52 di KH_2PO_4 portando a 1000 cc. con una soluzione di NaCl al 0,4%. Sterilizzare le due soluzioni a 120°C per 20' miscelandole, al momento dell'uso, nelle proporzioni necessarie ad ottenere il pH 7,6.

2) Estratto liquido di fegato: sciogliere g. 40 di polvere di estratto di fegato (Lilly n. 343) e g. 4 di $Na_2HPO_2 \cdot 12H_2O$ in acqua distillata portando a cc. 50: si ottiene un liquido di consistenza pastosa. Sterilizzare in autoclave a 120°C per 20'.

3) Polvere di amido di riso sterilizzata (Bacto-Rice Starch Powder Difco): distribuire pochi grammi in un tubo (18 × 150 mm.) e porre in stufa a 160-180°C per 1h, ripetendo l'esposizione per altre 2 volte, a 24h di intervallo.

Per prepare il terreno di incistamento si mettono in un tubo cc. 20 della soluzione salino-fosfatata-tamponata a pH 7,6; cc. 0,20 dell'estratto di liquido di fegato e 2-3 ansate di amido di riso. Il pH iniziale del terreno non dovrà essere inferiore a 6,8. Dopo 48h d'incubazione a 37°C comincia, in genere, l'incistamento dei trofozoiti.

Riferiamo ora in particolare i risultati ottenuti coll'uso di ciascuno dei tre metodi scelti.

Metodo di Dobell. — Come già nelle prove precedenti, il metodo di Dobell, pur così facile nella sua esecuzione e quindi senza possibilità di errori di tecnica, che possano pregiudicarne gli effetti, ha dato di volta in volta risultati discordi, sia per la quantità che per la qualità delle cisti prodotte.

(*) Usare Agar depurato.

Nella generalità dei casi, la maggior parte delle cisti non è arrivata a maturazione, così che ne è stato difficile il successivo excistamento, reso ancora più disagevole dalla gran quantità di polvere di riso nella quale l'esiguo numero di cisti tetranucleate presenti si trova disperso.

Metodo di Stone. — Anche questo metodo ha dato risultati incostanti con marcata difficoltà di completa maturazione delle cisti stesse.

Metodo di Chang. — Il metodo di Chang, per quanto decisamente più complesso sia per ciò che concerne l'adattamento dei trofozoiti che per quanto attiene allo incistamento vero e proprio, è quello che ha dato, nella presente ricerca, i risultati migliori.

Attenendoci scrupolosamente alla tecnica descritta dall'autore, noi abbiamo potuto ottenere da tutti i ceppi usati, per ben 10 volte consecutive, cisti abbondanti e perfettamente mature, che si sono di poi excistate regolarmente nel terreno di coltura di Boeck - Drbohlav sia immediatamente dopo il loro incistamento, sia a distanza di un mese ed oltre da questo. Tali cisti infatti sono state ancora utilizzate per la esecuzione di indagini che formano oggetto di altra nota (Buonomini, Ricciardi, Gozzi 1958).

Concludendo si può dire che i metodi di Dobell e di Stone, malgrado la loro estrema semplicità di esecuzione, non offrono sufficienti garanzie per un buon incistamento di *E. histolytica* «in vitro».

Il sistema di Chang dà, invece, risultati buoni e costanti, ed è da preferirsi a quello di Zuckermann e Meleney, perchè meno costoso e più facilmente attuabile. Il suo impiego nella routine potrà rendere utili servizi per lo studio della biologia di *E. histolytica.*

Conclusioni

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo quindi esprimere un giudizio pienamente positivo nei confronti del metodo di Chang per l'incistamento «*in vitro*» di *E. histolytica.* Esso non appare per nulla inferiore all'ottimo metodo di Zuckermann e Meleney, studiato e utilizzato con ottimi risultati da uno di noi (Ricciardi).

Data la possibilità di eseguire il metodo di Chang usando materiali facilmente reperibili sul mercato, si evitano gli svantaggi del metodo Zuckermann e Meleney, per il quale è necessario fare uso del «Cerophil», non reperibile in Italia.

Alcune prove comparative eseguite con varii estratti di fegato (Powder Liver Extract n. 50 - Lilly, e Estratto di fegato gentilmente fornitoci dalla Ditta Vister di Casatenovo Brianza) hanno poi dimostrato come anche usando estratti diversi da quello originale utilizzato dall'autore (Lilly n. 343) si possono ottenere egualmente risultati soddisfacenti.

RIASSUNTO

Gli autori esaminano comparativamente i metodi di Dobell, di Stone e di Chang, proposti per l'incistamento « in vitro » di *E. histolytica*.

Dai risultati ottenuti, utilizzando 7 stipiti diversi di *E. histolytica*, concludono per la superiorità del metodo di Chang, che permette di ottenere risultati regolari e facilmente ripetibili in serie.

SUMMARY

The authors study comparatively the Dobell, Stone and Chang's methods for producing encystment in cultures of *E. histolytica*.

On the basis of the results obtained with seven different strains of *E.h.* the autors emphasize the use of Chang's method which always gives regular and satisfactory results.

BIBLIOGRAFIA

Buonomini G., Ricciardi M. L. e Gozzi E. (1958): Sulla resistenza delle cisti di *E. histolytica* in varie condizioni ambientali. Nota I° - Durata della contaminazione di piantine di insalata (*Lactuca sativa*). (In corso di stampa su: *Giorn. Mal. Inf. Parassit.*).

Chang S. L. (1943): Observations concernig encystation, maturation, ad excystation of *E. histolytica*, and on the longevity of culture induced cysts in various fluids and at different temperature. *J. Infect. Dis.*, 72 232.

Chang S. L. (1946): The relation of oxidation-reduction potensials to the growth excystation and excystation of *Endamoeba histolytica* in culture. *Parasitology* 37, 101.

De Blasi R. e Ricciardi M. L. (1957): Studi sulla biologia di *E. histolytica*. II. Osservazioni sul fenomeno dell'incistamento e studio comparativo di vari metodi per ottenerlo « in vitro ». *Nuovi An. Ig. e Microbiol., VIII*, 138.

Dobell C. e Laidlaw P. (1925): On the cultivation of *E. histolytica* and some other entozoic amoebae. *Parasitology, 18*, 283.

Stone W. (1935): A method of producing encystment in cultures of *Endamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med., 15*, 681.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 3 Luglio 1958

DISTINZIONE DEI CEPPI STABILMENTE APATOGENI DI *E. HISTOLYTICA* DA QUELLI PATOGENI IN FASE AVIRULENTA

I. DE CARNERI

La biologia delle entamebe a cisti tetranucleate parassite dell'uomo si va in questi ultimi anni progressivamente chiarendo. Fra i maggiori contributi recenti alla conoscenza di questo campo sono da considerare da un lato il riconoscimento di *Entamoeba hartmanni* come una distinta sub-specie (HOARE 1949, 1952) o specie (BURROWS 1957) non patogena e d'altro canto la constatazione che *E. histolytica* può talvolta assumere forme «nane» minori di quanto prima si credeva e capaci di trasformarsi in forme a diametro maggiore (MELENEY e ZUCKERMANN, 1948; BUCCO e CHIEFFI, 1955; BURROWS, 1957).

Sembra inoltre confermato che, come sosteneva BRUMPT (1925, 1949) esistano ceppi di *E. histolytica* stabilmente apatogeni, con cisti da 6,4 a 15,2 μ (secondo BURROWS) e con trofozoiti da 7 a 15,9 μ morfologicamente indistiguibili dalle cisti e dai trofozoiti in forma «minuta» dei ceppi attualmente o potenzialmente patogeni. Una distinzione fra i due tipi, ovviamente della massima importanza sotto numerosi punti di vista, si può avere solo in base ai risultati di infezioni intestinali sperimentali di animali sensibili. Un'unica prova diretta non può però dare una risposta esauriente, come risulterà chiaro da quanto segue. NEAL (1951, 1956), NEAL e VINCENT (1955), OKAMOTO (1953) ed una serie di ricercatori russi (SCHENSNOVICH, 1955; AVAKYAN, 1955; ROGOVA, 1956) iniettarono endocieco a giovani ratti albini (vedi JONES, 1946) dei trofozoiti di ceppi isolati di recente e misero in evidenza che i ceppi provenienti da portatori sani sono meno virulenti di quelli provenienti da persona affetta da dissenteria amebica. Questi dati non ci dicono però quanti fra i ceppi del primo gruppo fossero stabilmente apatogeni e quanti invece avessero una virulenza solo transitoriamente attenuata. Che i ceppi patogeni possano talvolta dar luogo ad

---

(*) *Istituto d'Igiene e Microbiologia dell'Università di Pavia* e *Istituto Carlo Erba per Ricerche Terapeutiche - Laboratorio di Microbiologia* (Direttore: Prof. L. CHECCACCI).

infezioni limitate al lume intestinale, comportandosi a lungo come commensali innocui senza ulcerare le pareti del cieco e del colon, è un fatto noto da lungo tempo (vedi WESTPHAL, 1937). Che essi in queste condizioni conservino tuttavia, almeno per qualche tempo, la patogenicità, lo dimostra tra l'altro la singolare constatazione di HUNNINEN e BOONE (1957): questi autori, studiando la virulenza di 37 ceppi verso l'intestino del coniglio, trovarono che, sebbene in generale i ceppi più virulenti fossero quelli isolati da ammalati di dissenteria amebica, il più virulento fra tutti era un ceppo isolato da un portatore asintomatico. Pare d'altro canto assodato che in tali condizioni saprofitiche la virulenza di *E. histolytica* vada gradualmente decrescendo (WESTPHAL, 1950; vedi DE CARNERI, 1958a) analogamente a quanto avviene dopo lunga coltivazione in vitro. E' però generalmente ammesso che la patogenicità latente possa essere ravvivata mediante passaggio in animali particolarmente recettivi; ad es. THOMPSON e coll. (1954), NEAL (1957) e DE CARNERI (1958b) restituirono la virulenza verso l'intestino del ratto a dei ceppi di *E. histolytica* che l'avevano persa dopo prolungata coltivazione in vitro, passandoli ripetutamente nel fegato di *Cricetus auratus*. Questa procedura è da preferirsi a quelle che si giovano di iniezioni nel retto o in altre zone dell'intestino del gatto o di altri animali, perchè solo con essa si possono riportare in cultura le amebe associate con le sole specie batteriche inizialmente presenti, senza contaminazioni con altri batteri intestinali dotati di azione imprevedibile.

Si potrebbe approfittare di questa possibilità di mettere in evidenza la patogenicità dei ceppi in cui essa è latente, per stabilire finalmente la distribuzione nel mondo dei ceppi patogeni e dei ceppi stabilmente apatogeni. Sull'argomento c'è tutta una letteratura nutrita dalle diverse scuole; la francese con BRUMPT dualista; la tedesca con REICHENOW e WESTPHAL unicista, che sottolinea l'importanza dell'ambiente e dei batteri associati; l'americana con CRAIG e FAUST che considera *E. histolytica* patogena anche per i cosidetti «portatori sani». Di conseguenza, da troppo tempo dura la polemica sull'utilità o meno di sottoporre a trattamento terapeutico i portatori asintomatici di *Entamoeba histolytica*. Io credo che una risposta definitiva a questo interrogativo possa essere data in ogni singolo paese dopo che, sotto gli auspici e il controllo di un'autorità competente, che potrebbe essere l'Organizzazione Mondiale della Sanità, si sia provveduto ad un'indagine sulla diffusione nelle varie parti del mondo dei ceppi stabilmente apatogeni, usando un metodo di «screening» simile a quello che noi qui proponiamo.

1) Il medico o il parassitologo che riscontrano nelle feci di un individuo delle cisti o dei trofozoiti di *E. histolytica* che rientrano nei diametri suddetti, allestiscono delle culture e le spediscono a degli Istituti specializzati.

2) Qui si procede all'infezione endociecale di almeno 10 ratti giovani, secondo la tecnica descritta in dettaglio da DE CARNERI (1958 a). I ceppi che pro-

ducono un alto livello di infezione (Average Degree of Infection = A. D. I.) vanno considerati come patogeni in fase virulenta.

3) Tutti i ceppi che appaiono avirulenti devono essere passati per 5-10 volte di seguito nel fegato dell'hamster dorato. Si può discutere sull'opportunità di aggiungere al ceppo in esame, durante questi passaggi, delle culture di batteri accuratamente isolati a partire da culture di ceppi patogeni di *E. histolytica* (vedi il caso del ceppo P + A' in: DE CARNERI, 1958 d).

4) Le amebe devono essere quindi portate in cultura e poi iniettate nel cieco di una diecina di ratti. I ceppi patogeni che si trovavano in una fase temporanea di avirulenza, dopo questi passaggi nel fegato rivelano la loro patogenicità verso l'intestino del ratto; quelli che, dopo il trattamento sopra descritto, non risultano dannosi per il ratto, devono essere considerati come stabilmente non patogeni anche per l'uomo.

L'esecuzione delle varie fasi dello « screening » è in generale abbastanza semplice, come risulta da quanto è stato scritto da NEAL e VINCENT (1956) e, per quanto riguarda ceppi divenuti avirulenti in vitro, da DE CARNERI (1958 a, b,). Non vanno tuttavia taciute alcune difficoltà. Sarà necessario mettersi d'accordo sul valore limite dell'A.D.I. che separa i ceppi virulenti da quelli non virulenti: NEAL (1957) tende a porre un limite piuttosto alto, mentre io credo che anche la presenza di pochi ratti lievemente ulcerati nel gruppo iniettato possa far considerare patogeno un ceppo di *E. histolytica* (1958 c, d).

A parte questo, il procedimento di virulentazione nel fegato di *Cricetus auratus* può essere in qualche caso gravemente ostacolato dalla parallela virulentazione dei batteri associati. E' noto che *E. histolytica* è di solito coltivata in vitro in presenza di batteri. BALSAM e SHAFFER (1958) hanno del resto dimostrato che l'insediamento di *E. histolytica* nel fegato di *Cricetus auratus* è grandemente facilitato dalla presenza dei batteri associati. E' necessario però prevenire una loro eccessiva moltiplicazione e a questo scopo si procede generalmente ad una immunizzazione preventiva degli hamster (REINERTSON e THOMPSON, 1951) o all'instillazione intraepatica ed endoperitoneale di antibiotici antibatterici inattivi sui protozoi (DE CARNERI 1958 a).

Nonostante queste precauzioni già NEAL e VINCENT (1956) dovettero interrompere lo studio di un ceppo RD perchè i batteri, divenuti virulenti, portavano rapidamente a morte gli hamster prima che le amebe potessero attecchire nel loro fegato.

Io ho incontrato le stesse difficoltà studiando il ceppo VI di cui a titolo esemplificativo si parlerà più avanti. Si espone anche qui di seguito il risultato ottenuto nel caso più semplice di un altro ceppo denominato Mandan.

CEPPO MANDAN.

Venne isolato al Tropen Institut di Amburgo il 7-2-1958 dalle feci del marinaio indiano sessantenne Dewa Mandan, da Bombay, ricoverato in clinica e trovato affetto da dissenteria amebica con trofozoiti in forma « magna » e da ascesso amebico epatico. Il Dr. WESTPHAL, Direttore del Reparto di Protozoologia dell'Istituto, mi diede gentilmente un ramo del ceppo nel giugno 1958.

Il 30 giugno 1958 procedetti a Milano all'infezione di 10 ratti. In seguito ad una mortalità insolitamente elevata potei procedere 96 ore dopo all'autopsia ed all'esame del cieco di solo 7 animali superstiti. Ricordo qui che ad ogni animale si assegna un valore discriminante che va da 0 (= nessuna ameba nel cieco) ad 1 (= pochissime amebe nel lume del cieco), a 2 (= molte amebe nel lume del cieco) a 3 (= microscopiche lesioni amebiche nella parete del cieco, rivelate dall'esame microscopico a fresco della raspatura della mucosa preventivamente lavata), a 4 (= ulcerazioni amebiche macroscopiche nella parete), fino ad un massimo di 5 (= vaste lesioni amebiche interessanti gran parte del cieco). Nel nostro caso si ottennero i seguenti risultati: 4 - 4 - 5 - 4 - 4 - 4 - 5. A.D.I. = 4,29. Tutti i ratti avevano lesioni amebiche di varia gravità nel cieco: in due lesioni erano particolarmente gravi. Senza ulteriori indagini si può definire il ceppo Mandan come patogeno in fase virulenta.

CEPPO VI.

Lo studio di questo ceppo non ha portato a conclusioni definitive e qui viene riportato solo per dare un esempio delle difficoltà che s'incontrano talvolta usando il metodo di virulentazione basato sul passaggio nel fegato di *Cricetus auratus*. Il ceppo VI fu isolato al Tropen Institut di Amburgo il 18 maggio 1955 da feci contenenti cisti e trofozoiti in forma « minuta ». Il portatore era asintomatico ed era stato sottoposto ad un esame rutinario al momento del rientro in Germania dopo 17 anni di soggiorno in Sud Africa.

Il Dr. WESTPHAL mi diede gentilmente un ramo del ceppo nel febbraio 1956. La flora batterica associata non permetteva un'abbondante crescita di amebe. Ripetuti tentativi di sostituire questi batteri con altri più favorevoli diedero scarso risultato. Nella primavera 1957, a Milano, ho eseguito un'infezione endociecale su un gruppo di ratti iniettando ad ognuno 250.00 trofozoiti nel cieco. L'A.D.I. ottenuto è stato basso, = 0,8. Nessun ratto presentava ulcerazioni. La prova fu ripetuta, con analogo risultato. Si può quindi escludere che questo fosse un ceppo patogeno in fase virulenta. Fu iniziata allora una serie di passaggi nel fegato usando un totale di 12 hamster, ma dopo 2 passaggi successivi i batteri cobionti diventavano estremamente virulenti, portando a morte gli animali per setticemia entro 10 ore, senza apparenti lesioni epatiche.

Anche l'aggiunta di miscele di penicillina 1000 U/cc e diidrostreptomicina

1000 μg/cc alle sospensioni di amebe e batteri prima dell'iniezione non diminuiva la mortalità degli hamster. Le culture da materiale prelevato dal fegato nella zona delle iniezioni furono sempre negative per le amebe. Lo studio ulteriore di questo ceppo fu perciò abbandonato, senza poter appurare se si trattava di un ceppo stabilmente apatogeno o di un ceppo patogeno in una fase di avirulenza temporanea.

Un comportamento simile ho riscontrato anche nei batteri associati ad un ceppo di *E. moshkovskii* (De Carneri, 1958 e). Tuttavia con altri 4 ceppi di *E. histolytica* di cui qui non parlo più estesamente perchè il loro caso è già stato trattato nei lavori già citati, ho potuto eseguire numerose serie di passaggi nel fegato senza interferenze da parte dei batteri.

Il metodo qui proposto è quindi applicabile nella maggior parte dei casi. Nel corso di indagini di massa credo che, dopo i primi tentativi, sia bene accantonare i ceppi associati a flore batteriche particolarmente sfavorevoli; senza perdere inutilmente settimane o mesi di lavoro insistendo nei tentativi di addomesticare un ceppo ribelle, sarà più proficuo estendere in un primo tempo l'indagine a numerosi altri ceppi più facilmente trattabili.

RIASSUNTO

Per poter decidere in quali Paesi sia giustificato un trattamento terapeutico dei portatori asintomatici di *E. histolytica*, si considera necessario uno studio della distribuzione dei ceppi patogeni e di quelli stabilmente apatogeni. A questo scopo numerosi ceppi isolati in cultura, accompagnati da una dettagliata descrizione del caso, dovrebbero essere spediti a laboratori attrezzati per eseguire le seguenti ricerche:

1) Primo « screening » dei ceppi direttamente virulenti per l'intestino di giovani ratti albini.

2) Tentativo di virulentazione di tutti i ceppi risultati avirulenti. Alle loro culture si aggiunge la flora batterica isolata accuratamente da un ceppo virulento di *E. histolytica* e la nuova mescolanza di amebe e di batteri viene iniettata più volte di seguito nel fegato di una serie di *Cricetus auratus*.

3) Le amebe vengono riportate in cultura e partendo da questa si esegue una seconda infezione intestinale nei ratti albini: i ceppi che risultano ora virulenti si possono considerare come patogeni originariamente in fase avirulenta.

I ceppi che non danneggiano il ratto in questa seconda prova si possono considerare stabilmente apatogeni anche per l'uomo.

Si accenna alle difficoltà che può causare l'aumento della virulenza dei batteri associati. Sono riportati due esempi pratici.

SUMMARY

In order to decide in which countries therapeutic treatment of asymptomatic *E. histolytica* carriers should be carried out, it is considered that the distribution of pathogenic and of stable apathogenic strains should be studied. For this purpose, many strains accompanied by a detailed description, should be despatched to laboratories equipped for performing the following tests:

1) First screening of the strains directly virulent to young white rats.

2) Attempts to turn the resulting avirulent strains into virulent ones. The bacterial flora carefully isolated from a virulent strain of *E. histolytica* is added to their cultures and the new mixture of amebae and bacteria is injected serially several times into the livers of a number of *Cricetus auratus*.

3) The amebae are recultured and the cultures used to perform a second intestinal infection in white rats: the strains which now appear as virulent can be considered as pathogens originally in an avirulent phase.

The strains which do not affect rats in this second test may be considered stable apathogens, also for man.

Mention is made of the difficulties which may arise from an increase in the virulence of the associated bacteria. Two practical examples are given.

BIBLIOGRAFIA

Avakyan A. A. (1955): (Characteristics of the etiology, epidemiology and clinical course of amebiasis.). *Zhur. Mikrobiol. Epidemiol. i. Immunobiol.*, 56-61. (In russo. Riassunto in inglese in *Biol. Abstr.*, 6732, 1958).

Balsam T., Shaffer J. G. (1958): The effect of viable bacteria on the capacity of a strains of large-race *Entamoeba histolytica* to produce abscesses in the hamster liver. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 7, 17-19.

Brumpt E. (1925): Etude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n. sp., amibe a kystes quadrinucléés parasite de l'homme. *Bull. Acad. Méd. 94*, 943 - 952.

Brumpt E. (1949): Précis de Parasitologie, 6a ed., Masson, Parigi.

Bucco G., Chieffi G. (1955): Sulle varietà morfologiche di *Entamoeba histolytica*. II Variazione del diametro dei ceppi. *Riv. Parassitol., 16*, 3-6.

Burrows R. B. (1957): *Endamoeba hartmanni*. *Am. J. Hyg.*, *65*, 172-188.

de Carneri I. (1958a): Studi sulla virulenza di *Entamoeba histolytica*. I. Variazioni cicliche della virulenza di un ceppo di *Entamoeba histolytica* nell'infezione intestinale del ratto albino da parte di due ceppi di *Entamoeba histolytica* dopo lunghi periodi di apparente apatogenicità. (In corso di stampa su *Giorn. Mal. Inf.*).

de Carneri I.: (1958b): Studi sulla virulenza di *Entamoeba histolytica*. II. Riacquisto della virulenza verso il ratto albino da parte di due ceppi di *Entamoeba histolytica* dopo lunghi periodi di apparente apatogenicità. (In corso di stampa su *Giorn. Mal. Inf.*).

de Carneri I. (1958c): On the pathogenicity and virulence of three laboratory strains of *Entamoeba histolytica*. (In corso di stampa su *Atti* 6° *Congr. Internaz. Med. Trop. e Malaria, Lisbona*).

de Carneri I. (1958d): Recherches sur l'origine possible de souches apathogènes de *Entamoeba histolytica*. (In corso di stampa su *Bull. Soc. Pathol. Exot*).

de Carneri I. (1958e): Studi su *Entamoeba moshkovskii*. II. *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941, come potenziale parassita: sua sopravvivenza nelle infezioni sperimentali intraepatiche dell'hamster e endociecali del ratto albino. *Riv. Parassitol., 19*, 161-168.

Hoare C. A. (1949): Handbook of medical Protozoology, Baillière, Tindall & Cox, London.

Hoare C. A. (1952): The commensal phase of *Entamoeba histolytica*. *Exper. Parasitol., 1*, 411-427.

Hunninen A. V., Boone H. A. (1957): Studies on the pathogenicity of various strains of *Entamoeba histolytica* in the rabbit. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *6*, 32-49.

JONES W. R. (1946): The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica;* with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. *Ann. Trop. Med. 40*, 130-140.

MELENEY H. E., ZUCKERMAN L. K. (1948): Note on a strain of small race *Endamoeba histolytica* which became large in culture. *Am. J. Hyg., 47*, 187-188.

NEAL R. A. (1951): Some observations on the variation of virulence and response to chemotherapy of strains of *Entamoeba histolytica* in rats. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 44*, 439-452.

NEAL R. A. (1956).: Strain variation in *Entamoeba histolytica.* III. The influence of the bacterial flora on virulence to rats. *Parasitology, 46*, 183-191.

NEAL R. A. (1957): III. Virulence in *Entamoeba histolytica. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 51*, 313-319.

NEAL R .A., VINCENT P. (1955): Strain variation in *Entamoeba histolytica.* I. Correlation of invasiveness in rats with the clinical history and treatment of the experimental infections *Parasitology, 45*, 152-162.

NEAL R. A., VINCENT P. (1956): Strain variation in *Entamoeba histolytica.* II. The effect of serial liver passage on the virulence. *Parasitology, 46*, 173-182.

OKAMOTO J. (1953): A comparison of strains of *Entamoeba histolytica* with special reference to their pathogenicity. II. On the rate of infection and ulcer formation in albino rats which were orally administered with cysts. *Kitasato Arch., 26*, 93.

REINERTSON J. W., THOMPSON P. E. (1951): Experimental amebic hepatitis in hamsters, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 76*, 518-521.

ROGOVA L. I. (1956): (Pathogenicity of strains of dysentery amoeba recovered from healthy carriers.). *Med. Parasit. & Parasitic. Dis. Mosca, 25*, 330-335. (In russo).

SCHENSNOVICH V. B. (1955): (A study of the pathogenicity of strains of *Entamoeba histolytica* isolated from healthy carriers.). *Med. Parazitol.*, 317-321. (In russo. Riassunto in inglese in *Biol. Abstr.*, 6747, 1958).

THOMPSON P. E., MCCARTHY D., REINERTSON J. W. (1954): Observations on the virulence of *Endamoeba histolytica* during prolonged subcultivation. *Am. J. Hyg., 59*, 249-261.

WESTPHAL A. (1937): Betrachtungen und experimentelle Untersuchungen zur Virulenz der *Entamoeba histolytica* beim Menschen. *Arch. Schiffs -u. Tropen-Hyg., 41*, 262-279.

WESTPHAL A. (1950): Die Amöbenruhr. In: GRUNDEL, « Die ansteckenden Krankheiten », 4ª ed., 1, 602.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 3 Luglio 1958

INFECTIONS A *SCHISTOSOMA MANSONI* CHEZ LA SOURIS INFESTEE PAR LES CERCAIRES D'UN SEUL PLANORBE INFESTE LUI-MEME PAR UN SEUL MIRACIDIUM

E. LAGRANGE (*)

Dans deux mémoires précédents (1, 2), j'ai étudié les infections de souris à *S. mansoni* par les cercaires d'un seul planorbe exposé dans les conditions normales à plusieurs miracidiums.

Dans le présent travail , j'ai au contraire infesté des planorbes par un seul miracidium.

Un premier planorbe (*P. pfeifferi*) a été infesté par Mr. W. ADAM en isolant un oeuf qui éclot ensuite dans le récipient *après* isolement.

Dans mes expériences, au contraire, j'ai fait éclore des oeufs émis dans les déjections de souris infectée par *Pl. glabratus;* avec une pipette, j'aspire le liquide et j'en dépose une goutte sur toute une série de porte-objets. Quelques uns d'entr'eux montrent un ou parfois plusieurs miracidiums; dans ce dernier cas, je les sépare.

On dépose ensuite chaque miracidium dans un verre de montre avec un ou deux centimètres cubes d'eau et un planorbe qu'on y laisse jusqu'au lendemain, immobilisé par un fragment de porte-objet déposé sur lui. Six semaines plus tard, on observe que certains émettent des cercaires. On peut alors infecter par les cercaires d'un même planorbe isolé une ou plusieurs souris, soit l'une après l'autre si les cercaires sont peu nombreuses, soit simultanément.

En deux séries, j'ai exposé 105 planorbes à cette infestation. 6 sont morts au cours de l'incubation, 14 se sont infectés et 10 d'entr'eux ont servi à infecter des souris avec les résultats ci-dessous. Chaque planorbe a servi à infecter 2 à 3 souris, mais dans 4 cas, il n'est resté qu'une survivante sur deux. Trois planorbes on été infectés le 14 août, les 11 autres entre le 1r et le 4 octobre 1957.

6 planorbes ont donné sur la souris des infestations unisexuées mâles (planorbes 1, 5, 6, 7, 9, 10);

4 planorbes ont donné des infestations unisexuées femelles (pl. 1A, 2, 4, 8);

(*) *Institut royal des sciences naturelles, Bruxelles.*

Planorbe	Nombre souris infectées	Sexe des Schistosomes	Nombre de Schistosomes dans le foie	Nombre de Schistosomes dans le mésentére	Date de l' infestation planorbe	Date de l' infestation souris	Mort naturelle n) ou provoqué (s)	Observations
1 A.	1	♀	2	—		13 6 57	13/8 s.	Une deuxième souris morte au lendemain de son infestation
1	3	♂	—	—	14/8	15/10	21/11 n.	
		♂	26	4	,,	,,	11/12 s.	
		♂	16	—	,,	,,	11/12 s.	
2	2	♀	2	—	13/8	21/10	16/12 s.	Une autre dévorée
3	3	♂ ♀	3	1 couple	14/8	21/10	19/12 s.	
		♀	1	—	,,	,,	23/12 s.	
		♀	2	4	,,	,,	30/12 s.	
4	2	♀	21	2	1/10	5/11	3/1/58 s.	ébauche de canal gynécophore, mais peau lisse sans papilles
		♀	20	9	,,	,,	14/1 s.	
5	3	♂	9	3	1/10	8/11	8/1 s.	
		♂	9	2	,,	,,	9/1 s.	
		♂	17	2	,,	,,	9/1 s.	
6	2	♂	7	1	1/10	12/11	16/1 s.	
		♂	9	5	,,	,,	16/1 s.	
7	2	♂	4	—	3/10	18/11	17/1 s.	1 autre souris morte prématurément
8	1	♀	3	1	3/10	18/11	20/1 s.	
9	2	♂	6	1	3/10	18/11	21/1 s.	
		♂	14	5	,,	,,	21/1 s.	
10	2	♂	3	—	3/10	18/11	24/1 s.	1 autre souris morte prématurément et dévorée

1 planorbe a donné sur 3 souris 2 infestations de sexe femelle et sur une 3e souris une infestation du même type mais avec un couple dans le mésentère. (pl. 3).

L'ensemble de ces résultats a été résumé dans le tableau ci-contre. Chaque souris a été autopsiée quand les circonstances le permettaient. Le foie a été écrasé entre deux lames de verre et les parasites enlevés au pinceau. L'intestin tout entier a été détaché de même avec le mésentère et réparti en plusieurs fragments, l'attention se portant surtout sur les vaisseaux mésentériques et les lobules de graisse et ganglions lymphatiques où on a le plus de chances de trouver les parasites.

En général, l'infection provoquée dans ces conditions donne des vers d'un seul sexe et demeure stérile; les mâles arrivent à maturité sexuelle car on y distingue nettement les testicules; les femelles si elles ne se trouvent pas en présence d'un mâle demeurent minuscules et n'arrivent pas à maturité sexuelle. Il faut signaler cependant des exceptions.

Le planorbe 3 a servi à infester trois souris; chez toutes trois, l'infection est du sexe femelle. Chez l'une cependant, on découvre un couple dans le mésentère et aussi bien dans le foie que dans le mésentère quelques oeufs immatures peu nombreux. Les deux autres souris sacrifiées quelques jours après n'ont montré ni mâles ni oeufs. Comme le nombre total de parasites est très faible, la présence de ce couple unique est particulièrement significative.

Le planorbe 4 a montré quelques femelles présentant des expansions latérales qui font penser à une ébauche de canal gynécophore. Ce sont pourtant bien des femelles; leur peau est lisse, sans papilles et elles sont filiformes. Pas d'oeufs.

Les infections du planorbe ont été tantôt abondantes et prolongées, dans d'autres cas, de très courte durée (2 jours) et peu abondantes.

Précédemment, j'avais cherché et réussi à prouver la possibilité de guérison de la souris, phénomène qui avait été signalé par JAFFÉ, MAYER et PIFANO (3). C'est pourquoi j'avais retardé la date de l'autopsie.

Ici, j'ai surtout cherché, sans succès d'ailleurs, à retrouver les parasites hermaphrodites qui ont été signalés dans le travail précédent et dont la description détaillée sera faite par Mr. W. ADAM (4).

A l'autopsie, régulièrement, le foie a macroscopiquement un aspect normal, luisant et au microscope montre du pigment en plus ou moins grande abondance. Ce qui frappe le plus dans les infections à parasites d'un seul sexe, c'est l'absence des oeufs qui sont innombrables dans les infections normales et qui provoquent une vive réaction du foie.

RESUME

Les infections à *S. mansoni* provoquées par les cercaires sorties d'un seul planorbe infecté par un seul miracidium donnent des parasites d'un sexe et sont stériles. Sur 23 souris, il faut pourtant compter une exception, où un couple a été trouvé dans le mésentère.

RIASSUNTO

Undici *Planorbis* sono stati infestati ciascuno con un solo miracidio di *S. mansoni*, e quindi usati per infestare 23 topolini in modo che ognuno di questi ricevesse solo cercarie di un solo mollusco. In tutti i topolini le infestazioni sono risultate unisessuali e sterili, eccetto in uno in cui nel mesentere sono state trovate una coppia e poche uova immature.

SUMMARY

Infected with *S. mansoni* (each of them with a single miracidium) eleven *Planorbis* have been used to infect altogether 23 mice, each mouse receiving only cercariae of one of these infected snails. All these infections did prove unisexual and sterile except in one mouse, where a couple and a few immature eggs were found in the mesentery.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 3 Luglio 1958

PARASSITISMO INTESTINALE E POSIZIONE AUXOLOGICA DEL BAMBINO. (Nota I.)

MARCELLO RICCI (*) e SALVATORE CORBO (**)

In una precedente ricerca orientativa abbiamo cominciato ad occuparci degli eventuali influssi esercitati dai parassiti intestinali sull'accrescimento infantile. I risultati in essa ottenuti non ci parvero tali da consentire di trarre definitive conclusioni, come del resto ovvio data la natura orientativa della ricerca stessa, e ci ripromettemmo quindi di tornare sull'argomento svolgendolo su più larga scala. Nella presente, ed in una seconda nota di prossima pubblicazione, saranno per l'appunto esposte le risultanze ottenute dalla nostra nuova indagine.

* * *

Alla esposizione dei dati sperimentali riteniamo opportuno premettere alcune considerazioni generali relative alla ricerca: illustrare cioè gli elementi da cui siamo stati mossi alla presente indagine e dare ragione dei metodi con cui l'abbiamo affrontata.

Vari tra i parassiti intestinali più comuni dell'uomo, ed in particolare del bambino, vengono generalmente considerati di assai scarsa se non nulla importanza pratica in quanto non producenti nella grande maggioranza dei casi alcun apparente disturbo; a sostegno della totale o quasi assenza di patogeneticità militando d'altronde, per vero, anche il fatto della loro talora larghissima diffusione in soggetti in apparenti condizioni di buona salute. E' ora del tutto giusta una simile valutazione? Fino a qual punto effettivamente giunge la presunta innocuità di tali parassiti?

La mancanza di una sintomatologia nel soggetto parassitato non implica obbligatoriamente un'assenza totale di azioni patogenetiche da parte del parassita; affermarlo significherebbe venire a contraddire alla definizione stessa di parassita quale elemento estraneo all'organismo dell'ospite e che a spese di questo provvede a sopperire ai propri bisogni vitali; definizione che per l'ap-

(*) *Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Parassitologia, Roma.*
(**) *Federazione Provinciale O.N.M.I., Latina.*

punto implicitamente stabilisce la presenza di almeno una minima azione spogliatrice in ogni caso di parassitismo. Affermato questo principio il problema che si pone è a nostro parere quello di vedere se le varie gradazioni di intensità dell'azione patogenetica che potremmo dire subliminali a quel valore di soglia oltre il quale si determina una sintomatologia di sofferenza passino o no senza lasciar traccia nell'organismo dell'ospite, e ciò specie quando si prolunghino per anni e su elementi di delicata sensibilità quali appunto sono degli esseri in accrescimento. Le ricerche preliminari sopra ricordate, in unione ad elementi vari scaturiti dalla pratica diretta di ormai numerose indagini parassitologiche, ci hanno convinto che in moltissimi casi l'azione patogenetica dei parassiti intestinali cosidetti banali, anche se di per sè stessa assai lieve, finisce, prolungandosi nel tempo, per assurgere ad entità tale da arrecare danni più o meno sensibili al soggetto infestato, in particolare interferendo sulla regolarità del suo accrescimento.

La dimostrazione di tale assunto presenta purtroppo una estrema difficoltà. L'unico mezzo con il quale si potrebbe sicuramente ed elegantemente risolvere il problema, e cioè l'esame comparato nel corso degli anni di sviluppo, naturalmente in assenza di elementi influenti estranei quali ad esempio una malattia debilitante intercorrente, tra soggetti privi in partenza di parassiti intestinali e mantenuti costantemente tali e soggetti infestati in partenza e pure mantenuti costantemente tali per tutta la durata dell'osservazione, è praticamente irrealizzabile. Dovendosi quindi ricorrere a mezzi di indagine indiretta, abbiamo pensato di affrontare il problema mediante la valutazione della posizione auxologica del bambino ed il contemporaneo riconoscimento delle sue condizioni quanto a parassitismo intestinale.

Tale metodo presenta il fianco ad una critica di valore fondamentale: è chiaro infatti che può apparire del tutto arbitrario voler trarre illazioni sull'andamento che presenta un fenomeno dinamico, quale squisitamente è lo sviluppo di un organismo, sulla base di un unico rilievo effettuato nel corso di questo. Ad essa si può solo obbiettare quanto segue: è un fatto che non si possa stabilire l'antichità o meno di uno stato di parassitosi osservato, e lo stesso vale per i soggetti sani; ma l'esperienza ci ammaestra anche di come in ambienti fortemente infestati, e tali sono senza dubbio alcuno quelli da noi presi in esame, il parassitismo intestinale inizi certamente molto presto; pressochè costante assenza di fenomeni immunitari, o loro brevissima durata, accompagnati alla possibilità di reinfestazione per la continua esposizione assicurano in seguito lunga durata al parassitismo; per converso, questi stessi fatti permettono anche di ipotizzare una certa capacità di resistenza alle parassitosi intestinali da parte di qualcuno almeno dei soggetti rilevati indenni da parassiti. Considerazioni queste che, aggiungendosi alla moltiplicazione delle osservazioni operata onde i valori trovati assumessero significatività statistica, ci indu-

cono a ritenere che il sistema di indagine da noi adottato possa almeno fornire utili indicazioni alla soluzione del problema propostici.

***

Abbiamo preso in esame le intere popolazioni delle scuole elementari di Itri e Maranola, centri della parte più meridionale della provincia di Latina con molte caratteristiche in comune.

Itri è situata a 68 km da Latina, e a 10 da Formia, ad una altitudine di m. 170; è un Comune di circa 7.500 abitanti, con un popolazione delle scuole elementari di circa 800 bambini. Ha economia prevalentemente rurale, con una massa di braccianti impiegati anche nei vicini Comuni. L'igiene domestica è assai spesso scadente in quanto risente della carenza di acqua dovuta alla mancanza nel paese di una condotta di distribuzione interna; i servizi igienici si ritrovano per esempio solo nelle nuove costruzioni. In genere l'acqua è attinta a pochi fontanili pubblici.

Maranola è un frazione del Comune di Formia, a 3 km da questa ad una altitudine di m 269; ha circa 2.800 abitanti, con una popolazione scolastica di 290 bambini. Le condizioni igieniche e quelle economico-sociali sono sostanzialmente analoghe a quelle di Itri.

Per ogni soggetto è stato effettuato: 1, un prelevamento con il nastro di cellofan adesivo (metodo di Graham) per la ricerca degli ossiuri; 2, un esame parassitologico delle feci — esame a fresco in soluzione fisiologica e con Lugol doppio, arricchimento per le uova di elminti con soluzione cloruro-sodica satura —; 3, la ripresa dei dati antropometrici: peso, statura, perimetro toracico. Gli esami di cui ai numeri 1 e 3 sono stati effettuati nello stesso giorno, mentre l'esame delle feci è stato compiuto nei giorni successivi. Abbiamo potuto raccogliere dati completi per 796 soggetti, su oltre 1.000 presi in esame, e solo su di essi verterà ovviamente il nostro studio.

I dati antropometrici sono stati elaborati con i seguenti metodi: in base ai due elementi: statura e peso, mediante le tabelle auxologiche di De Toni; in base a tutte e tre le misurazioni effettuate, mediante le tabelle auxologiche di Correnti. In questa prima nota riferiremo solo i dati relativi alla elaborazione con il primo dei due metodi; in fig. 1 riproduciamo la grafica auxometrica ad esso relativa.

Abbiamo preso in considerazione solo i soggetti tipauxici e disauxici, scartando cioè tutti gli auxopatici. Questi ultimi sono stati complessivamente 29 di cui 8 senza parassiti e 21 parassitati; i primi appartenevano alle seguenti categorie: gigantismo semplice (1), gigantismo ipersomico (3), adiposità semplice (3), nanismo iposomico (1); i secondi: gigantismo semplice (2), gigantismo ipersomico (3), adiposità semplice (8), nanismo iposomico (1), nanismo iposomico (1), nanismo semplice (1), cachessia semplice (6).

I residui 767 soggetti comprendevano 60 casi senza parassiti e 707 con presenza di parassiti, da 1 a 7, e precisamente: 191 con uno, 238 con due, 170 con tre, 77 con quattro, 21 con cinque, 7 con sei ed infine 3 con sette. Nella

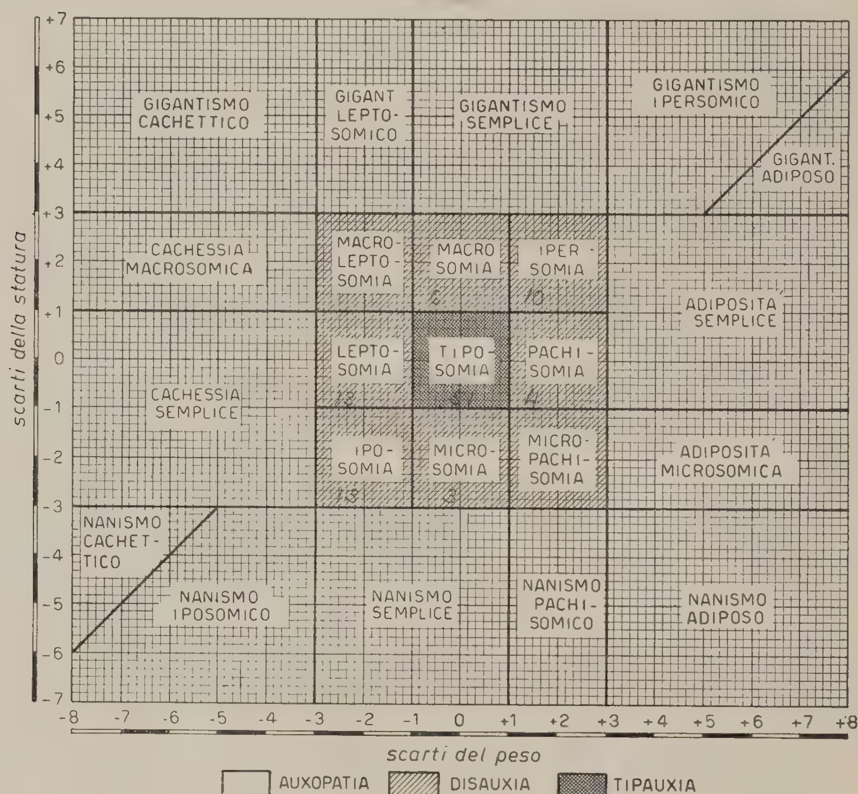


Fig. 1. — Grafica auxometrica di De Toni.

elaborazione dei dati, dato l'esiguo numero di soggetti delle ultime tre categorie, queste sono state conglobate con la precedente.

L'età dei soggetti non ha sostanzialmente influito sulla distribuzione dei parassiti (v. Tabella 1), ed ancor meno ha influito il sesso — per cui tutti i dati sono stati elaborati cumulativamente per i due sessi. — La distribuzione dei soggetti esaminati, parassitati e non, secondo le varie categorie auxologiche è rappresentata nella Tabella 2.

TABELLA 1.

Distribuzione percentuale dei soggetti di ciascuna classe di età a seconda del numero dei parassiti.

Età	Numero soggetti esaminati	Numero dei parassiti				
		0	1	2	3	4-7
6 anni	32	12,50	21,88	31,25	21,88	12,50
7 »	121	6,61	28,93	35,54	15,70	13,22
8 »	167	8,98	26,35	26,35	20,36	17,96
9 »	147	8,16	21,09	29,93	26,53	14,29
10 »	145	7,59	22,76	31,03	27,59	11,03
11 »	103	5,83	28,16	30,10	24,27	11,65
12 »	52	7,69	23,08	40,38	11,54	17,31
1-12 anni	767	7,82	24,90	31,03	22,16	14,08

TABELLA 2.

Distribuzione percentuale dei soggetti delle varie categorie auxologiche a seconda del numero dei parassiti.

Categoria auxologica	Numero dei soggetti	Numero dei parassiti					
		0	1	2	3	4-7	1-7
microsomi	16	—	2,62	2,42	2,35	1,85	2,27
iposomi	96	5,00	13,09	12,29	17,65	8,33	13,19
leptosomi	101	11,67	12,04	11,86	12,94	19,44	13,33
totale disauxici inferiori	213	16,67	27,75	26,27	32,94	29,64	28,79
tiposomi	384	41,67	47,12	51,27	50,59	57,41	50,92
macrosomi	52	13,33	7,33	6,36	4,71	6,48	6,24
ipersomi	80	16,67	10,99	11,44	10,00	4,63	9,93
pachisomi	36	11,67	6,81	4,66	1,76	1,85	4,11
totale disauxici superiori	168	41,67	25,13	22,46	16,47	12,96	20,28

Esaminando le percentuali presentate dai tipauxici, disauxici superiori e disauxici inferiori nel gruppo dei sani ed in quello complessivo dei parassitati si osserva chiaramente in questi una riduzione dei disauxici superiori a vantaggio sia dei disauxici inferiori che dei tipauxici. Il vaglio statistico (Tabella 3) rivela che le rispettive differenze di percentuale non sono significative per i tipauxici, ma che lo sono però sia per i disauxici superiori che per i disauxici inferiori: il che permette di concludere che la distribuzione delle tre categorie auxologiche considerate nella parte parassitata della popolazione in esame è differente da quella che si osserva nella parte non parassitata, e che la differenza è precisamente dovuta alla rispettiva diminuzione ed aumento, nei primi, dei disauxici superiori e dei disauxici inferiori.

TABELLA 3.

Confronto tra la distribuzione di soggetti sani e quella dei parassitati nei gruppi auxologici.

	Sani %	parassitati %	$D_{\%}$	t ($n > 30$)
tipauxici	41,67	50,92	9,25	1,376
disauxici superiori	41,67	20,28	21,39	3,847
disauxici inferiori	16,67	28,78	12,12	2,013 [1]

$P < 0{,}01$ per $n > 30$ e $t > 2{,}575$

[1] P è tra 0,05 e 0,02.

I grafici delle figure 2 e 3 rappresentano visivamente, utilizzando le stesse cifre ma con diversi orientamenti, tale andamento: nel primo si nota la progressiva riduzione della percentuale di disauxici superiori con l'aumento del numero dei parassiti, mentre, anche se meno intensamente, viene aumentando quella dei disauxici inferiori e così quella dei tipauxici; nel secondo come i soggetti senza parassiti siano in massima parte, ed in parti uguali, compresi tra i disauxici superiori ed i tipauxici, mentre tutti i parassitati comprendono essenzialmente tipauxici e disauxici inferiori.

Il grafico di fig. 4 mostra la distribuzione percentuale dei soggetti, nell'ambito di ciascuno dei tre gruppi auxologici considerati, a seconda del numero dei parassiti; le curve dei tipauxici e dei disauxici inferiori sono pressochè sovrapponibili, mentre da esse nettamente si distacca quella dei disauxici superiori per più accentuati valori per i senza o con un solo parassita e più bassi valori per quelli con 3 e 4-7 parassiti.

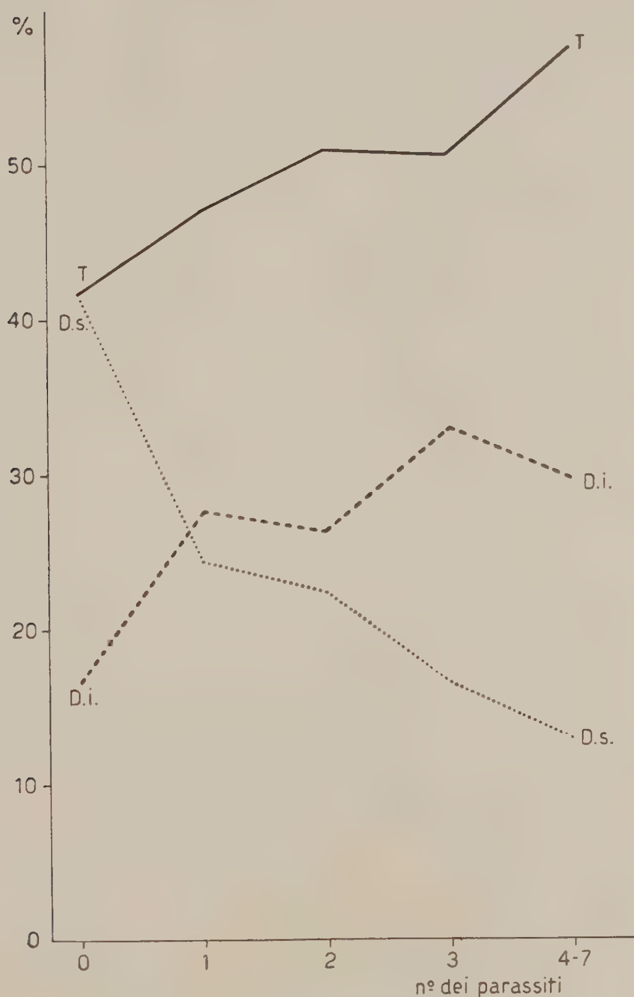


Fig. 2. — Distribuzione del parassitismo nelle categorie auxologiche (T. tipauxici; D.s., disauxici superiori; D.i., disauxici inferiori).

Una più precisa valutazione dei dati raccolti si è però pensato si potesse ottenere dalla diretta osservazione della distribuzione dei soggetti sulla grafica auxometrica; le varie categorie auxologiche in questa considerate non sono infatti sensibili che a scarti di un anno di anticipo o di ritardo, e possono quindi mascherare scarti dai valori medi di ciascun gruppo effettivi ma non troppo accentuati. Si è anche, in proposito, ritenuto opportuno considerare a

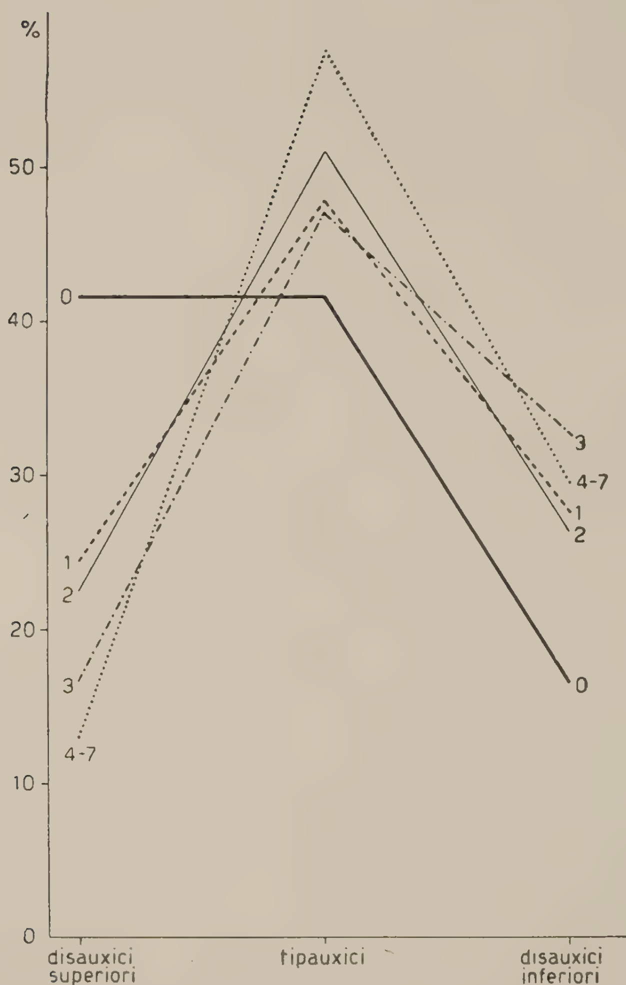


Fig. 3. — Distribuzione auxologica
a seconda del numero dei parassiti.

sè ogni singolo parassita ed ogni associazione parassitaria che fossero rappresentati da un numero di soggetti sufficientemente elevato da dare una certa significatività alla distribuzione. Va qui precisato che per aumentare il numero delle osservazioni sono stati aggiunti ai casi propri del parassita o dell'associazione parassitaria al momento considerati anche i casi di associazione tra essi e alcune specie notoriamente non patogene come *Entamoeba coli*,

Endolimax nana e *Jodamoeba bütschlii;* questi casi, il cui numero è in ogni grafico indicato tra parentesi dopo quello indicativo dei soggetti, propriamente pertinenti al tipo di parassitismo considerato, sono riconoscibili negli schemi delle distribuzioni in quanto indicati con crocette invece che con punti; essi non hanno palesemente portato differenze nell'andamento generale delle distribuzioni.

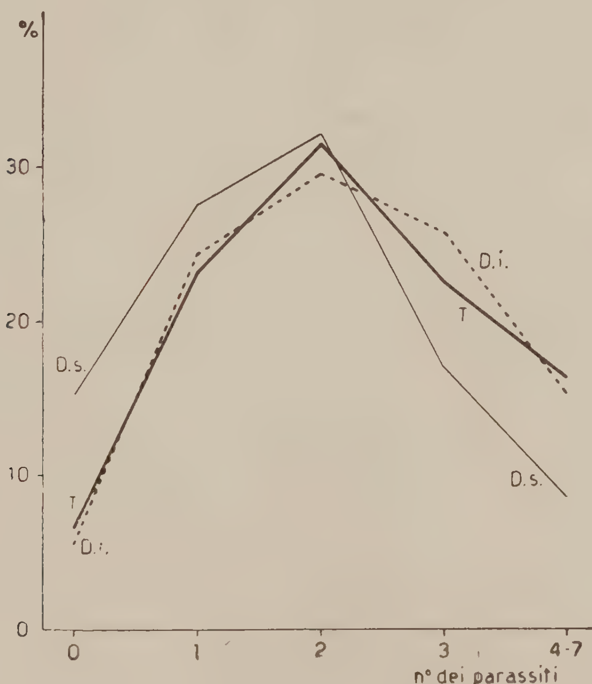


Fig. 4. — Distribuzione percentuale dei soggetti nell'ambito di ogni gruppo auxologico a seconda del numero dei parassiti.

L'esame di tali grafici sembra mostrare pressochè costantemente che nei confronti dei soggetti sani (fig. 5), per loro conto chiaramente dimostranti una netta tendenza della popolazione in esame verso la disauxia superiore, i soggetti parassitati (fig. 6-20) presentano una certa tendenza, più o meno accentuata a seconda dei casi, verso valori di disauxia inferiore o di tipauxia (anche quest'ultima, vista la tendenza alla disauxia superiore dei soggetti sani, può essere interpretata come un effetto negativo del parassitismo).

L'eccessivo divario tra il numero dei soggetti presentanti una parassitosi, singola o multipla, e l'altra non consente di poter approfondire l'esame fino a caratteri differenziali tra gli effetti che provocherebbe ciascuna; ciò che

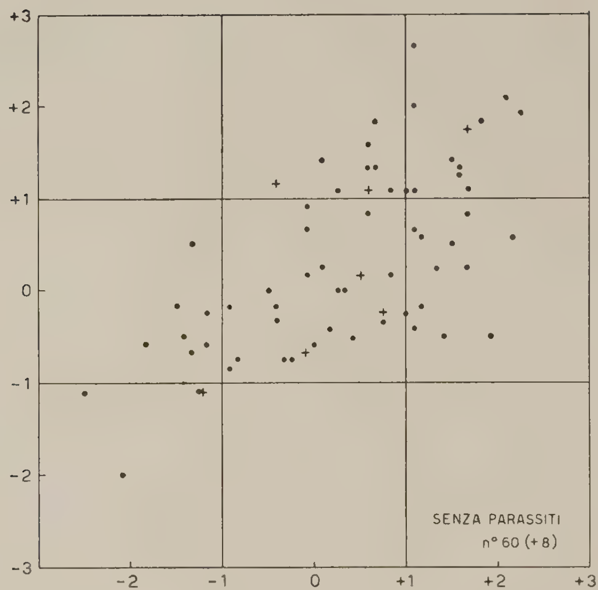

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
SENZA PARASSITI
n° 60 (+8)

Fig. 5

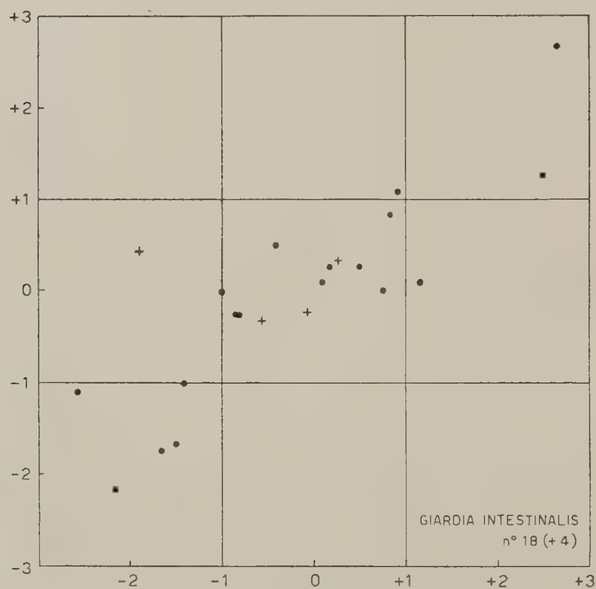

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
GIARDIA INTESTINALIS
n° 18 (+4)

Fig. 6

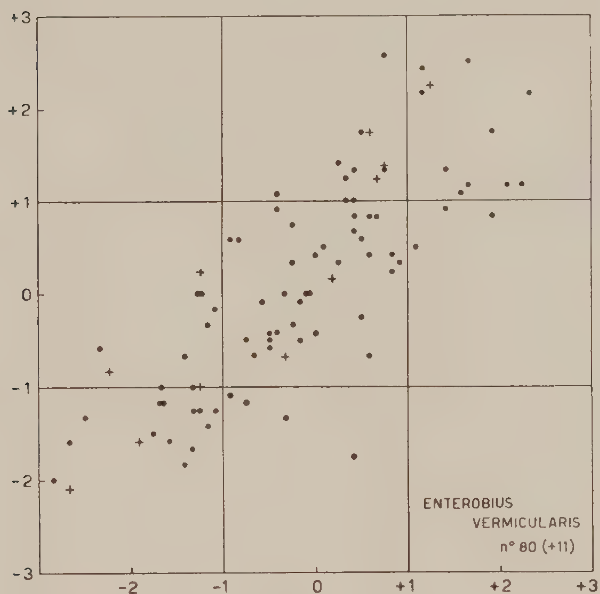

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
ENTEROBIUS
VERMICULARIS
n° 80 (+11)

Fig. 7

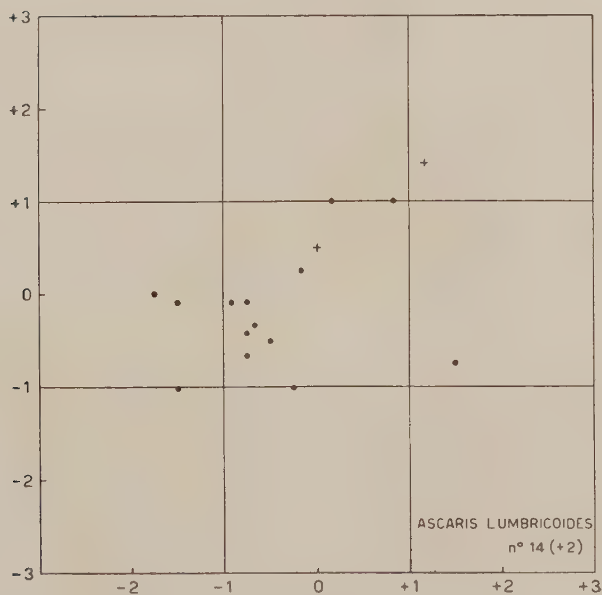
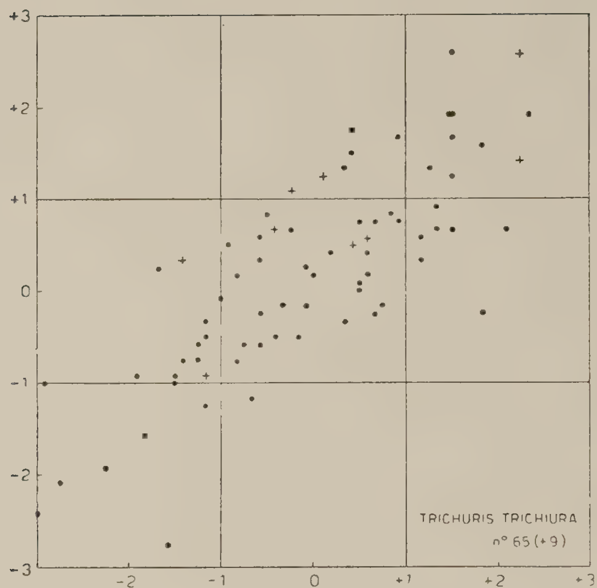
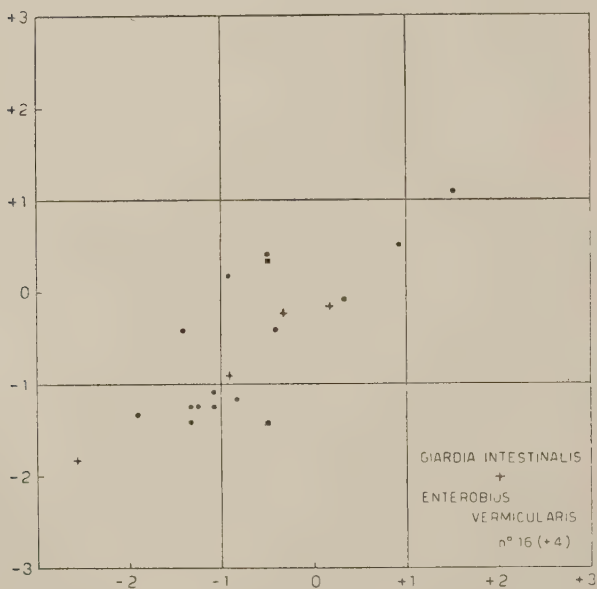

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
ASCARIS LUMBRICOIDES
n° 14 (+2)

Fig. 8



+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
TRICHURIS TRICHIURA
n° 65 (+9)

Fig. 9



+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
GIARDIA INTESTINALIS
+
ENTEROBIUS
VERMICULARIS
n° 16 (+4)

Fig. 10

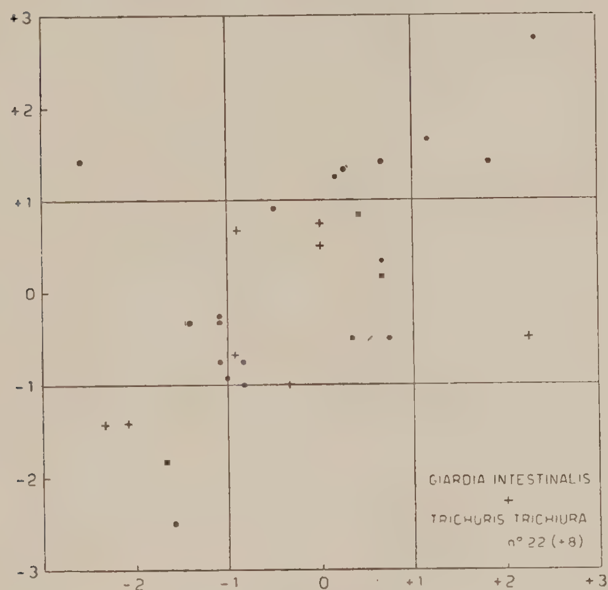

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
GIARDIA INTESTINALIS
+
TRICHURIS TRICHIURA
n° 22 (+8)

Fig. 11

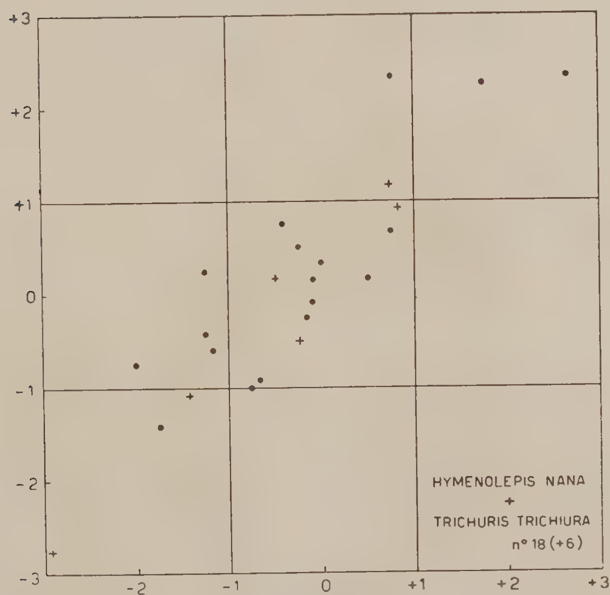

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
HYMENOLEPIS NANA
+
TRICHURIS TRICHIURA
n° 18 (+6)

Fig. 12

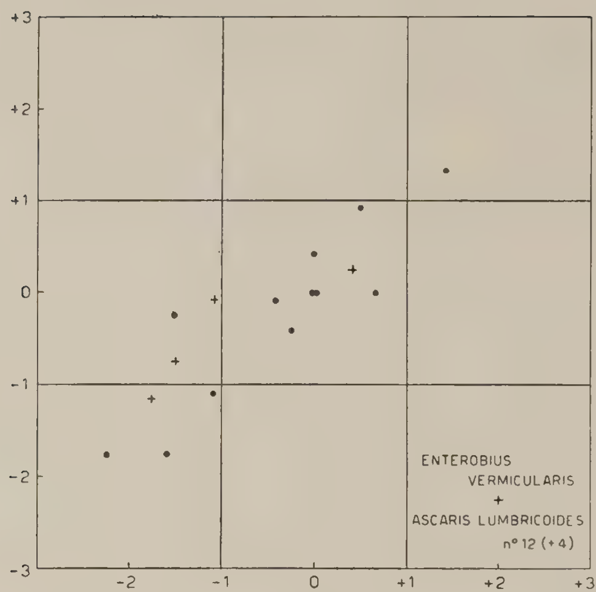

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
ENTEROBIUS
VERMICULARIS
+
ASCARIS LUMBRICOIDES
n° 12 (+4)

Fig. 13

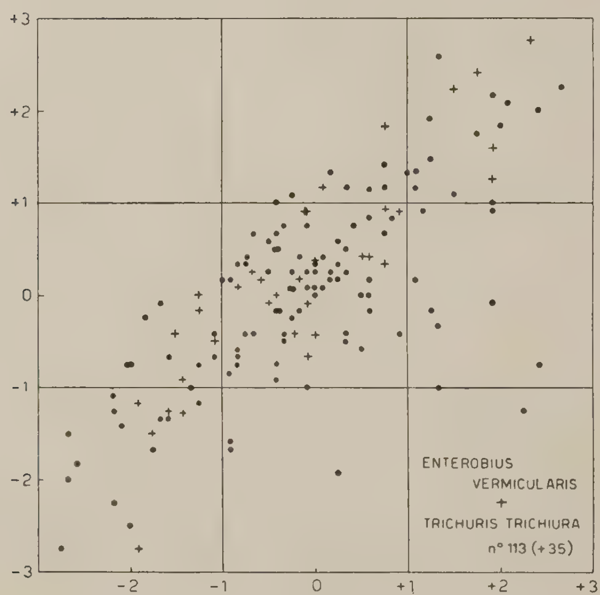

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
ENTEROBIUS
VERMICULARIS
+
TRICHURIS TRICHIURA
n° 113 (+35)

Fig. 14

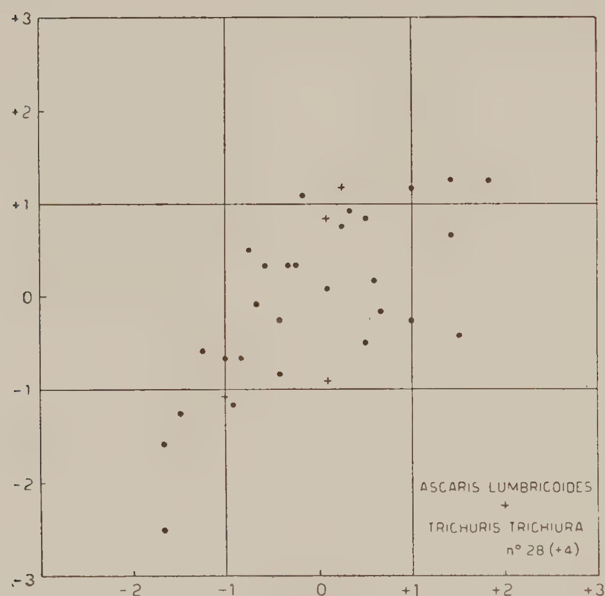

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
ASCARIS LUMBRICOIDES
+
TRICHURIS TRICHIURA
n° 28 (+4)

Fig. 15

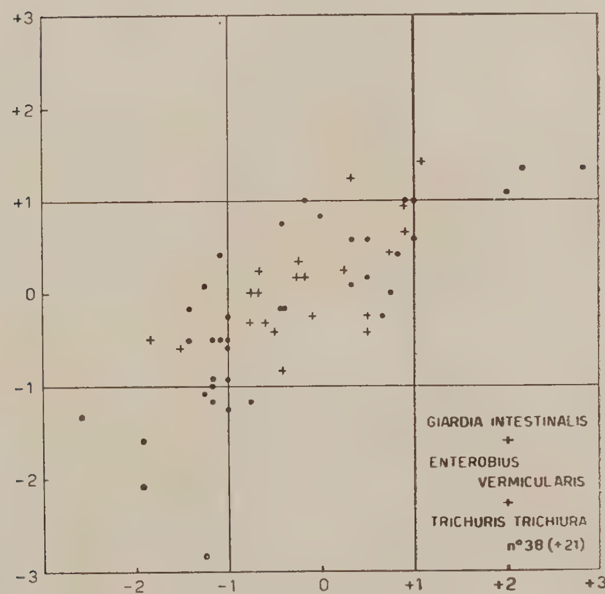

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
GIARDIA INTESTINALIS
+
ENTEROBIUS
VERMICULARIS
+
TRICHURIS TRICHIURA
n°38 (+21)

Fig. 16

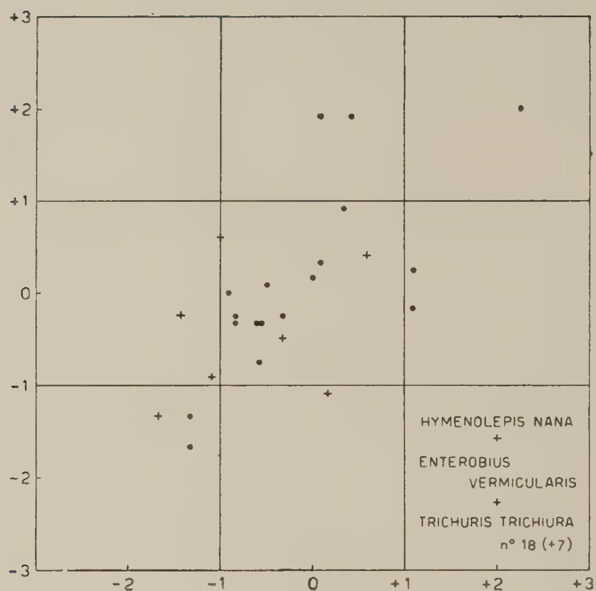

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
HYMENOLEPIS NANA
+
ENTEROBIUS VERMICULARIS
+
TRICHURIS TRICHIURA
n° 18 (+7)

Fig. 17

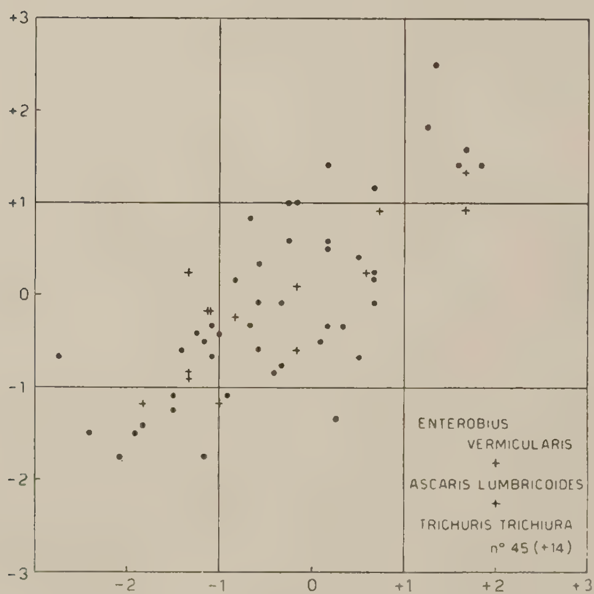

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
ENTEROBIUS VERMICULARIS
+
ASCARIS LUMBRICOIDES
+
TRICHURIS TRICHIURA
n° 45 (+14)

Fig. 18

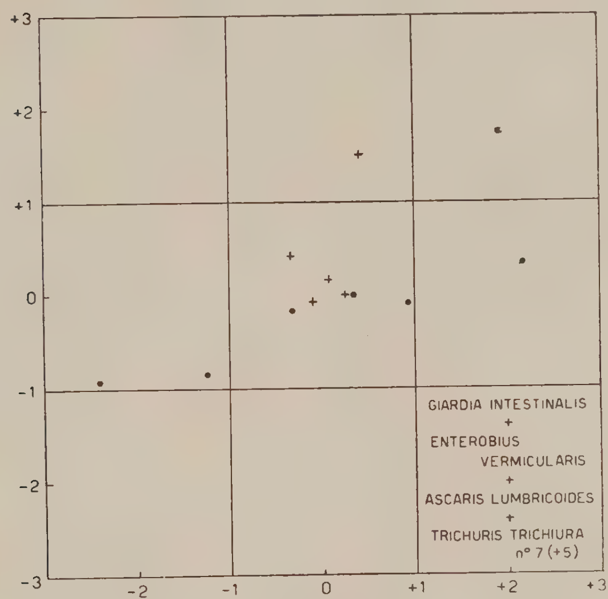

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
GIARDIA INTESTINALIS
+
ENTEROBIUS
VERMICULARIS
+
ASCARIS LUMBRICOIDES
+
TRICHURIS TRICHIURA
n° 7 (+5)

Fig. 19

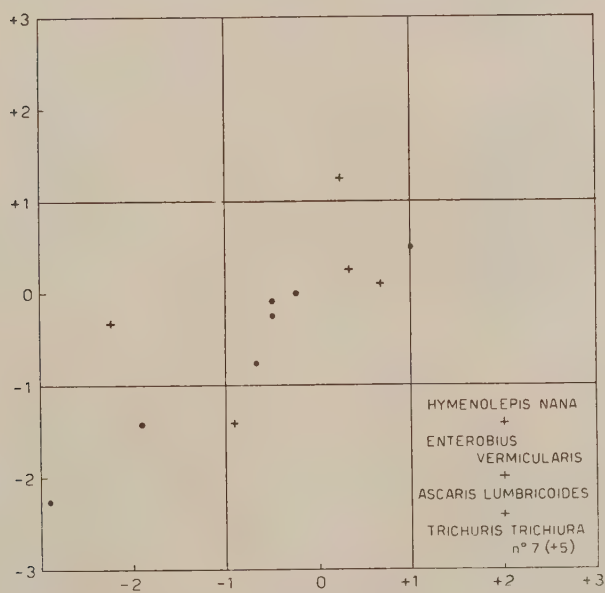

+3
+2
+1
0
-1
-2
-3
-2
-1
0
+1
+2
+3
HYMENOLEPIS NANA
+
ENTEROBIUS
VERMICULARIS
+
ASCARIS LUMBRICOIDES
+
TRICHURIS TRICHIURA
n° 7 (+5)

Fig. 20

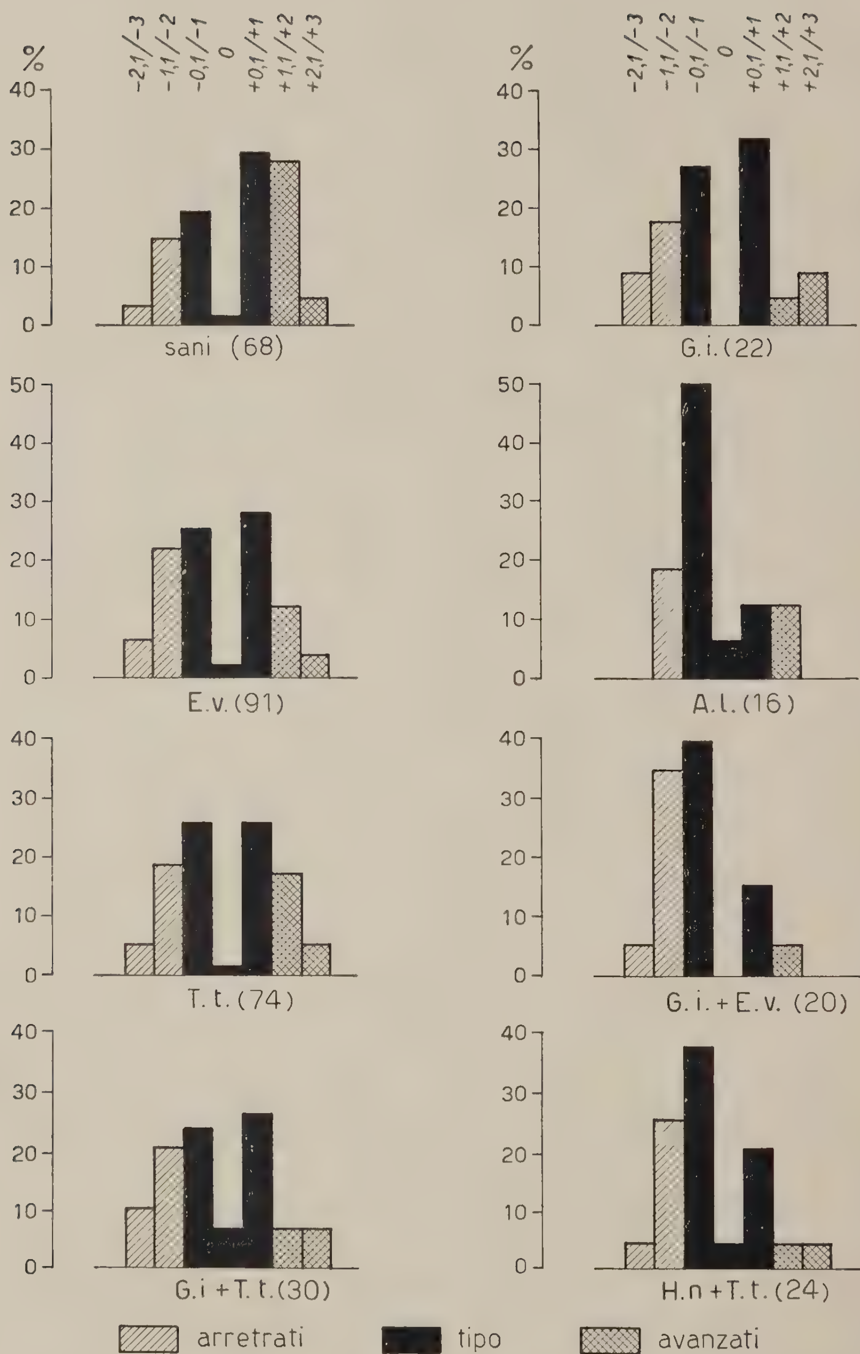
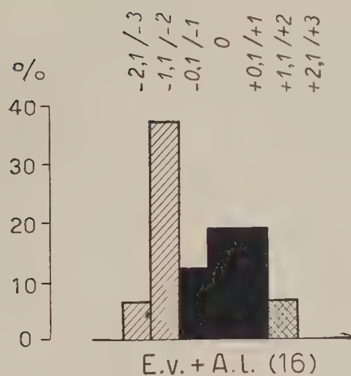
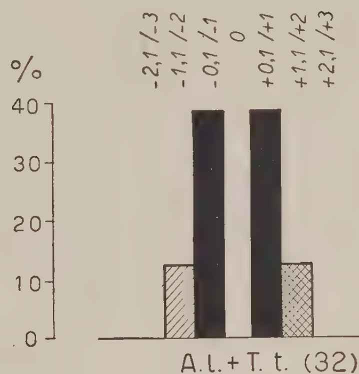
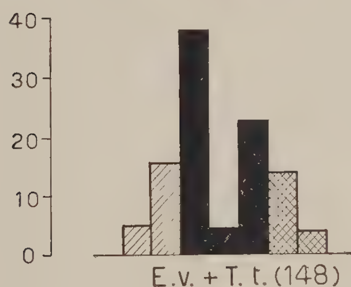
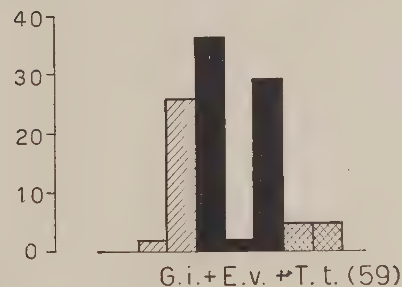


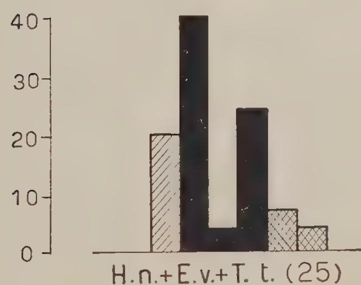
Fig. 21. — Distribuzione percentuale dei soggetti sani e variamente parassitati E.v., *Enterobius vermicularis;* A.l., *Ascaris*

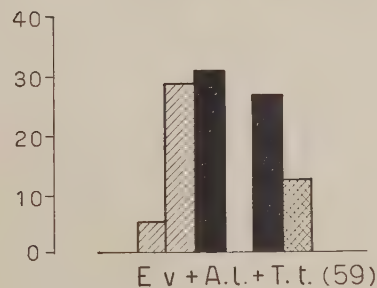


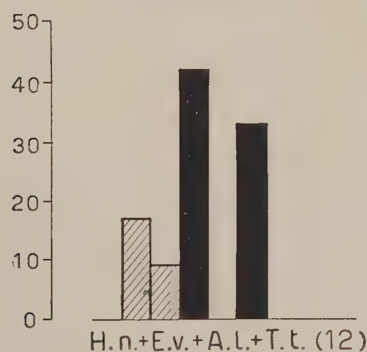


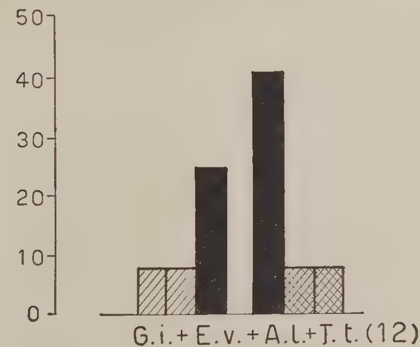












a seconda degli scarti del peso. (G.i., *Giardia intestinalis;* H.n., *Hymenolepis nana;* *lumbricoides;* T.t., *Trichuris trichiura*).

sarebbe come tentare di stabilire una graduatoria del potere patogeno dei vari parassiti isolati od in associazione. Ci sembra tuttavia che l'esame dei diversi grafici possa almeno fornire qualche indicazione in materia: tra quello di *Trichuris trichiura* (fig. 9) ad esempio, assai poco deviato dalla tendenza dei soggetti sani, in buon accordo con la scarsa o nulla patogeneticità riconosciuta a questo parassita almeno nelle non gravi infestazioni, e quello di *Giardia intestinalis* + *Enterobius vermicularis* (fig. 10), ambedue dotati sicuramente di una certa patogeneticità, corre un divario notevole.

***

Una indagine particolare, in base alle considerazioni espresse in apertura del presente lavoro in merito alla difficoltà di accettazione dei suoi risultati al complesso fenomeno dell'accrescimento, abbiamo voluto dedicare al comportamento di uno solo dei due elementi finora presi in esame, e cioè al peso; la maggiore influenzabilità di esso nel tempo ci ha fatto invero pensare che eventuali sue variazioni fossero più facilmente evidenziabili nei diversi gruppi dei nostri soggetti. La rappresentazione grafica dei risultati di questa indagine è data nella fig. 21; essa è abbastanza dimostrativa, ci sembra, del fatto della riduzione del peso che, nei confronti del gruppo dei soggetti sani, verrebbe a verificarsi in forma più o meno accentuata in ogni gruppo di soggetti parassitati.

La fig. 22 pone infine a confronto la distribuzione percentuale dei soggetti sani e di quelli rispettivamente parassitati solo da *Giardia intestinalis*, o *Enterobius vermicularis*, o *Ascaris lumbricoides*, o *Trichuris trichiura*, nelle tre categorie: avanzati da oltre 1 a 3 anni, tipo (avanzati fino a + 1 anno e arretrati fino a — 1 anno), arretrati da oltre 1 a 3 anni. Da essa chiaramente emerge la differenza tra soggetti sani e parassitati; e si ha anche una certa indicazione, pur con le limitazioni inerenti allo scarso numero di soggetti di qualche gruppo, circa un comportamento differenziale dei vari parassiti abbastanza corrispondente al valore patogeno riconosciuto a ciascuno di essi.

***

Le risultanze delle nostre ricerche esposte in questa prima nota si possono, in conclusione, così riassumere.

E' stata messa in evidenza una rispondenza tra parassitismo intestinale e posizione auxologica del bambino, valutata in base ai due elementi peso e statura. Il confronto tra i soggetti privi di parassiti ed il complesso dei parassitati ha dimostrato infatti differenze, statisticamente significative, nella composizione dei due gruppi quanto a categorie auxologiche: nei primi prevalgono i disauxici superiori ed i tipauxici, nei secondi i tipauxici ed i disauxici inferiori. La tendenza verso valori auxologici ridotti si evidenzia inoltre in

molti casi, mediante l'esame diretto della distribuzione sulla grafica auxometrica, anche considerando partitamente i vari parassiti o associazioni parassitarie.

Il confronto in base al solo elemento del peso tra il gruppo dei soggetti

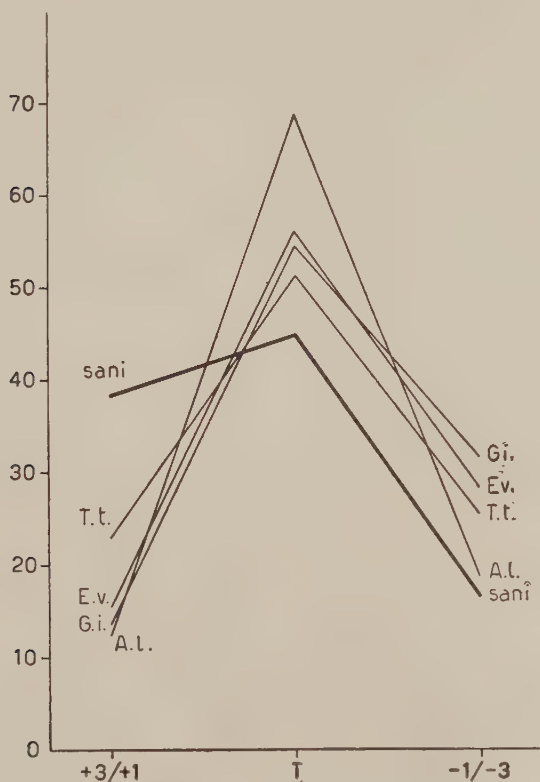


Fig. 22. — Distribuzione percentuale dei soggetti sani e di quelli con monoparassitismo da *Giardia intestinalis* (G.i.), *Enterobius vermicularis* (E.v.), *Ascaris lumbricoides* (A.l.) e *Trichuris trichiura* (T.t.) a seconda degli scarti del peso

sani ed i vari gruppi di quelli parassitati, in forma semplice o multipla, ha dimostrato con chiara evidenza la riduzione del peso, più o meno accentuata, nella maggior parte di questi ultimi. Si può osservare in proposito come questo fatto della, almeno assai probabile, sensibile influenza del parassitismo sul peso arrechi un valido appoggio indiretto all'ipotesi dell'influenza del parassitismo stesso sulla statura e, conseguentemente, sul fenomeno complessivo del-

l'accrescimento: se infatti l'azione parassitaria è capace di produrre variazioni in un fattore somatico, non si vede perchè soprattutto quando si prolunghi notevolmente nel tempo, non debba produrla nei confronti di altri che ad esso sono per giunta intimamente collegati.

RIASSUNTO

Oltre 1.000 bambini tra 6 e 12 anni di Itri e Maranola (Latina) sono stati sottoposti a misure antropometriche (peso, statura, perimetro toracico) e contemporaneamente a esami parassitologici (esame delle feci, scotch cellophane tape). Per 796 di essi, quelli cioè per cui si avevano dati completi, è stata studiata la posizione auxologica, elaborata con il metodo di De Toni che prende in considerazione solo il peso e la statura: eliminati 29 soggetti auxopatici, i residui 767 sono stati studiati in relazione alle condizioni del parassitismo intestinale.

Il confronto tra i soggetti privi di parassiti ed il complesso dei parassitati ha dimostrato differenze, statisticamente significative, nella composizione dei due gruppi quanto a categorie auxologiche: nei primi prevalgono i disauxici superiori ed i tipauxici, nei secondi i tipauxici ed i disauxici inferiori. La tendenza verso valori auxologici ridotti si evidenzia in molti casi, mediante l'esame diretto della distribuzione sulla grafica auxometrica, anche considerando partitamente i vari parassiti o associazioni parassitarie.

Il confronto in base al solo elemento del peso tra il gruppo dei soggetti sani ed i vari gruppi di quelli parassitati, in forma semplice o multipla, ha dimostrato con chiara evidenza la riduzione del peso, più o meno accentuata, nella maggior parte di questi ultimi.

SUMMARY

Over 1000 children, between 6 and 12 years of age, of Itri and Maranola (Latina) were subjected to anthropometric mensurement (weight, stature, thoracic perimeter) and at the same time to parasitological examination (examination of stool, scotch cellophane tape technic). For 796 of these, for which complete data were available, there was studied the auxological position, elaborated by the method of De Toni (who takes into consideration only weight and stature). After elimination of 29 auxopathic subjects, the rest (767) were studied in relation to conditions of intestinal parasitism.

By confrontation of the parasite-free subjects and the complex of parasitized subjects there were demonstrated statistically significant differences in the composition of the two groups as regards the auxological categories: in the first group there is a prevalence of the superior disauxic and the tipauxic subjects, while in the second group there is a preponderance of the tipauxic and the disauxic inferior subjects. The tendency towards auxological reduced values is evident in many cases by the examination of the distribution on the auxometric graphic, also if the various parasites or parasitic association are considered separately.

Comparison based on weight only between the group of parasite-free subjects and the various parasitized groups (simple or multiple parasitation), demonstrates clearly a more or less pronunced reduction in weight in majority of the parasitized subjects.

BIBLIOGRAFIA

below mean height & weight

CORBO S. e RICCI M. (1957): Accrescimento infantile e parassitismo intestinale, *Arch. It. Pediatr. Puericolt.*, *18*; 263 e *Rend. Ist. Sup. San.*, *21* (1958); 120.

DE TONI F. (1954): L'accrescimento umano. La Scuola Ed., Brescia.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 3 Luglio 1958

LUTTE CONTRE L'*ORNITHODORUS MOUBATA* DANS DEUX TERRITOIRES DU RUANDA - URUNDI

J. GEERTS, (*) H. MEYUS, (**) W. BERVOETS (***)
avec la collaboration de H. CAUBERGH (****)

I — Introduction:

Le présent article est un résumé de la lutte contre l'*Ornithodorus moubata* (Kimputu) menée de juin 1950 à juillet 1952 dans deux territoires du Ruanda-Urundi, Usumbura et Bubanza. Il mentionne les résultats obtenus jusqu'en 1957 à la suite de cette campagne.

II — Description de la zone traitee:

a) *emplacement et caractéristiques*:

Les deux territoires où la lutte a été menée font partiellement partie de la plaine bordant la rivière Ruzizi et le lac Tanganika. Peu accidentée, cette plaine a une altitude de 800 mètres dans le sud à hauteur d'Usumbura, altitude qui augmente graduellement jusqu'à 1.000 mètres dans le nord près de Bugarama. Une autre partie des deux territoires traités est située en montagne et la hauteur maximale y atteint environ 2.500 m.

b) *population et logement*:

Dans la zone envisagée vit un total de 140.000 habitants composé surtout d'autochtones Barundi et Watutsi.

On y trouve deux types de cases:

type A: case ronde ayant la forme d'une ruche; parois faites en tiges

---

(*) *Médecin Directeur du Service de l'Hygiène à Matadi.*
(**) *Médecin Directeur du Service de l'Hygiéne du Ruanda-Urundi.*
(***) *Inspecteur des Services de l'Hygiène du Congo Belge et du Ruanda-Urundi.*
(****) *Auxiliaire Médical.*

végétales et toit constitué de paille; moyenne du diamètre: environ 4 m.

type B: petite case rectangulaire, soit en pisé, soit en roseaux, avec toit de paille; longueur: de 5 à 9 m.; largeur: de 3 à 4 m.

c) *climat*:

Dans la plaine de la Ruzizi et du lac Tanganika le climat est tropical mais assez sec, avec une moyenne annuelle de 23° Celsius; le total annuel des pluies varie entre 800 et 900 mm.

En montagne le climat est froid et humide; la moyenne annuelle y est de 18° C. et le total annuel des pluies varie entre 1200 et 1300 mm.

III — Observations entomologiques:

Bien que l'*Ornithodorus moubata,* espèce xérophile, se trouve plus aisément dans les huttes construites dans la plaine, il n'est pas rare de le rencontrer également en montagne, à des endroits atteignant une altitude de plus de 2.000 m.

La terre du milieu des cases étant le plus souvent trop dure pour lui donner asile, l'*Ornithodorus moubata* se cache plutôt dans la poussière, dans les fissures des murs ou dans le sol meuble. Il a une préférence marquée pour les parois, pieds de lit, endroits où se fait le feu et dessous des portes d'entrée. Suivant les dires de indigènes, il grimperait le long des murs pour aller s'y cacher dans les lézardes et pour ensuite se laisser tomber soit sur le lit, soit sur le sol. On le trouve normalement à une profondeur de 2 à 5 cm. Il se rencontre néanmoins incidemment au centre des cases, mais comme cet endroit lui sert plutôt de refuge, il s'y abrite plus profondément, 5 à 10 cm. voir 20 cm.

Pour convenir à l'*Ornithodorus moubata* le sol ne peut être humide; sa composition peut être granuleuse, pierreuse, rocailleuse, sablonneuse ou argileuse. Il montre cependant une préférence pour le sable très finement granulé. Il est à remarquer que l'*Ornithodorus moubata* préfère aussi les cases en pisé ou en matériaux semi-durables aux huttes en paille; ceci est problement dû au fait que le cycle de reproduction n'arrive pas à terme dans les paillotes, dont la durée d'existence est d'ordinaire limitée.

IV — Travaux de deparasitation:

Les travaux de déparasitation se sont échelonnés sur trois campagnes de traitement de juin 1950 à juillet 1952.

a) *prospection avant la campagne*:

Des équipes de deux travailleurs procèdent à la prospection. Au cours de celle-ci la terre est remuée jusqu'à une profondeur de ± 20 cm., principalement

près du lit, du feu, des murs et de la porte. La terre est houée et étalée en couches très minces devant la porte. La chaleur du soleil pousse les Kimputus à chercher refuge, ce qui facilite la capture. Les équipes de prospecteurs visitent environ 25 a 30% des cases à traiter.

Nombre de cycles de prospection	Nombre de cases prospectées	Nembre de prospections
1 fois	14.574	14.574
2 fois	9.190	18.380
3 fois	5.489	16.467
4 fois	1.688	6.752
		56.173

b) *organisation des travaux*:

— *produits employés et dosage*:

La première fois nous avons employé le Solvexane 50B, produit à base d'hexachlorcyclohexane contenant 50% d'HCH technique, 7,5% insomère gamma. Notre choix s'est porté sur l'HCH parce que son action étant plus pénétrante et son effet de knock-down plus prononcé que ceux du DDT, nous espérions pouvoir compter sur une plus grande efficacité sur un insecte fortement chitinisé tel que l'*Ornithodorus*. La concentration était de 500 gr. par 10 l. d'eau et de 40 cm^3/m^2, soit uno bouillie de ± 5%.

Le deuxième produit à base d'HCH employé contenait 5% d'isomère gamma. Il a été utilisé à un dosage de 3,6 $^0/_{00}$, c. à d. 360 cc. à raison de 100 l. d'eau par case. (Cyclotox Solvay).

L'HCH agit sur les insectes à la fois par contact et par ingestion. La toxicité de ses vapeurs complète efficacement cette double action. L'HCH provoque sur les insectes des manifestations nerveuses auxquelles succèdent rapidement des phénomènes de paralysie suivis de mort.

— *matériel*:

pulvérisateurs à dos.

— *application du traitement*:

Dans chaque case nous avons traité:

à l'intérieur: — la surface du sol;
— les murs à 1 m. de hauteur;
— toute la cloison qui sépare les chambres de la hutte.

à l'intérieur: — le mur à 1 m. de hauteur;
— les rigoles de 20 cm. de largeur et de 20 cm.

de profondeur, creusées à l'intérieur et à l'extérieur des cases le long des murs.

La moyenne de superficie par case ainsi traitée se chiffre à:

20,65 m² pour le sol;
40,09 m² pour murs et cloison.

Le sol, qui avait été pralablement houé sur une profondeur d'environ 20 à 30 cm., a été mouillé du produit, tandis que les murs ont été aspergés à l'aide de pulvérisateurs.

Chaque sous-chefferie se révélant positive lors des prospections, a été traitée entièrement. Les traitements se sont suivis à six mois d'intervalle, jusqu'au moment où la dernière prospection effectuée soit négative. Ainsi, certaines collines ont subi respectivement 3, 2, 1 ou aucun traitement.

Cases traitées:

Nombre de cycles de traitement	Nombre de cases traitees	Total des cases traitées
1 fois	27.665	27.665
2 fois	9.287	18.474
3 fois	19.229	57.687
4 fois	—	—
		103.826

V — Resultats:

Pour contrôler l'efficacité du traitement nous nous sommes basés sur les résultats entomologiques — changements intervenus dans le nombre de cases infectées et dans le nombre d'*Ornithodorus moubata* —, et les résultats médicaux, — nombre de cas de Fièvre Récurrente et mouvement des malades dans les dispensaires —.

a) *contrôle entomologique*:

Les Kimputus touchées par le produit meurent en déans des trois jours. La sensibilité du Kimputu varie selon le stade de développement, les oeufs par exemple ne sont pas détruits. Il est par conséquent nécessaire d'appliquer un autre traitement après quelques mois d'intervalle.

Le tableau suivant est significatif:

Nombre de cycles de prospection	Changement dans le nombre de cases infectées	Changement dans le nombre de Kimputus
1 fois	541	19.945
2 fois	98	2.148
3 fois	28	1.818
4 fois	—	—

Il paraîtrait que la durée d'efficacité des produits à base d'HCH dans la terre pourrait être de 12 mois.

b) *contrôle médical*:

Le nombre de cas de Fièvre Récurrente a baissé spectaculairement dans les différents dispensaires des régions traitées.

Cas de fièvre récurrente déclarés:

Avant la campagne	: 1948	: 832 cas	
	: 1949	: 909 cas	
Campagne en cours	: 1950	: 610 cas	
	: 1951	: 76 cas	
	: 1952	: 9 cas	
Après la campagne	: 1953	: 5 cas	
	: 1954	: 2 cas	
	: 1955	: 0 cas	
	: 1956	: 1 cas	(étranger de passage)
	: 1957	: 0 cas	

VI — Conclusions:

Le campagne entreprise dans deux zones rurales du Ruanda-Urundi (Usumbura et Bubanza) durant les années 1950-52 a donné des résultats très satisfaisants. Six ans après la déparasitation la F. R. n'a pas refait d'apparition, ce qui prouve l'efficacité du traitement contre l'*Ornithodorus moubata* par dispersion d'HCH dans les cases indigènes.

RESUME

Trois campagnes de traitement contre l'*Ornithodorus moubata* par dispersion d'HCH dans les cases ont été entreprises dans deux zones rurales du Ruanda-Urundi, Usumbura et Bubanza, de juin 1950 à juillet 1952. Le contrôle de l'efficacité a été basé sur les résultats entomologiques — changement dans le nombre de cases infectées

et diminution du nombre d'*Ornithodorus moubata* — et sur les résultats médicaux — baisse spectaculaire de l'incidence de la fievre récurrente dans les différents dispensaires des zones traitées. Six ans après les campagnes, la fièvre récurrente n'a pas refait d'apparition.

RIASSUNTO

In due zone rurali del Ruanda-Urundi, Usumbura e Bubanza, sono stati effettuati dal giugno 1950 al luglio 1952 tre campagne di lotta contro *Ornithodorus moubata* a mezzo dell'irrorazione delle abitazioni con esaclorocicloesano. Il controllo dell'efficacia del trattamento è stato basato sia sui risultati entomologici — cambiamento del numero delle abitazioni infestate e diminuzione del numero di *O. moubata* — sia sui risultati medici — spettacolosa caduta dell'incidenza della febbre ricorrente nei vari dispensari delle zone trattate. A sei anni di distanza dalle campagne, la febbre ricorrente non è ricomparsa.

SUMMARY

Three campaigns of HCH home-spraying for the eradication of relapsing fever were carried out in the rural zones of Usumbura and Bubanza (Ruanda-Urundi) from june 1950 till july 1952. Control of efficacity was based on the entomological figures which indicate a change in the number of infected huts and a reduction in the number of *Ornithodorus moubata*, and also on the medical results which show a striking decrease in the incidence of the disease. Six years after the HCH treatment, not a single case of relapsing fever has been reported.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 3 Luglio 1958

SELEZIONE DI CEPPI DI *ANOPHELES ATROPARVUS* RESISTENTI AL DDT (*)

G. D'ALESSANDRO e M. MARIANI (**)

Le presenti indagini fanno parte di un gruppo di studi sulla resistenza degli insetti agli insetticidi svolti in questo Istituto a partire dal 1948 (D'ALESSADRO e MARIANI, 1953).

In questa nota riferiamo esperimenti diretti ad ottenere ceppi di *Anopheles atroparvus* resistenti al DDT e a fare luce, possibilmente, sulle modalità di insorgenza del fenomeno.

MATERIALI E TECNICHE.

Il ceppo di *Anopheles atroparvus* impiegato per le ricerche deriva da uova inviateci in parte dall'Istituto Superiore di Sanità (Roma) ed in parte dall'Istituto di Zoologia «Lazzaro Spallanzani» (Pavia). L'allevamento del ceppo viene realizzato in ambiente a temperatura controllata (26° ± 2° C) e con umidità relativa di circa il 70%, secondo le modalità descritte in altro lavoro (MARIANI, 1955).

I saggi di sensibilità al DDT degli adulti del ceppo di origine e dei ceppi da esso derivati sono stati eseguiti con il metodo descritto da BUSVINE e NASH (1954) e cioè in base alla DL_{50} ottenuta attraverso prove di contatto per un'ora, a 27° C, con carta Whatman n. 1 trattata con soluzioni di DDT tecnico in olio Risella, a varie concentrazioni, diluite con due volumi di tricloroetilene.

(*) Ricerche eseguite sotto gli auspici e con il contributo dell'Alto Commissariato per l'Igiene e la Sanità.

Notizie preliminari sui risultati degli esperimenti che qui descriviamo sono state trasmesse, periodicamente, alla Sezione Malaria ed alla Divisione igiene ambientale dell'O.M.S. che ne ha pubblicato i riassunti in varie circolari informative sul problema della resistenza (1956 e 1957).

(**) *Istituto d'Igiene dell'Università di Palermo* (Direttore: Prof. G. D'ALESSANDRO).

Come già rilevato in una precedente nota (MARIANI, 1956), le soluzioni di DDT tecnico in olio Risella, preparate volta per volta, non danno risultati omogenei e pertanto per il proseguimento delle ricerche abbiamo recentemente adottato, per l'allestimento delle soluzioni stesse, l'isomero p. p' del DDT.

Allo scopo di osservare rigorosamente il metodo, per ciascuna prova e in ciascun tubo sono stati introdotti costantemente 5-6 individui di uguale sesso.

Poichè la massima solubilità del DDT in olio Risella è del 3%, concentrazioni maggiori sono state ottenute preparando, al momento dell'uso, soluzioni in tricloroetilene alle quali venivano aggiunti due volumi di miscela in parti uguali di olio Risella e tricloroetilene. Con tale artifizio sono state ottenute concentrazioni fino al 15%.

Le varie prove sono state eseguite su un numero sufficientemente alto di individui e non si è creduto necessario sottoporre i dati a particolari elaborazioni statistiche. I valori medi di mortalità e sopravvivenza degli adulti sottoposti al contatto con le varie concentrazioni sono stati elaborati con il metodo di REED e MUENCH (1938), indi i dati medi di mortalità sono stati disposti su grafici probit-logaritmici (grafico 1) al fine di stabilire la LD_{50} grafica delle popolazioni saggiate.

Alcune prove sono state eseguite anche con il metodo descritto da MARIANI (1954); è stato, cioè, determinato il tempo minimo di contatto occorrente per ottenere la mortalità del 100% delle popolazioni saggiate su carta da filtro trattata con il 5% di DDT in xilolo, alla temperatura di 25° C.

Le sensibilità delle larve è stata determinata su gruppi di individui allo stesso stadio di sviluppo, trasferiti in soluzioni acquose di DDT, ottenute mescolando ad acqua di fonte una soluzione in alcole etilico all'1% di isomero p. p' del diclorodifeniltricloretano.

In linea generale la formazione di ceppi resistenti è stata realizzata con metodo selettivo allevando, cioè, gli individui sopravvissuti a trattamenti di vario tipo. Si è operato in modo che le popolazioni subissero una esposizione all'insetticida tale da produrre una mortalità di poco superiore al 50% e ciò allo scopo di mantenere nei ceppi selezionati un corredo genico sufficientemente ricco.

Per ciascun ceppo trattato allo stadio di adulto sono state utilizzate due gabbie: una per la schiusura delle pupe ed il primo pasto di sangue delle femmine prima del trattamento; l'altra per accogliere gli adulti sopravvissuti ai trattamenti, l'accoppiamento dei sessi, gli ulteriori pasti di sangue e la raccolta delle ovodeposizioni.

Le tecniche di dissezione, colorazione e lettura dei cromosomi politenici sono quelle descritte da FRIZZI (1953) per le larve, e da MARIANI e BRUNO (1957) per gli adulti.

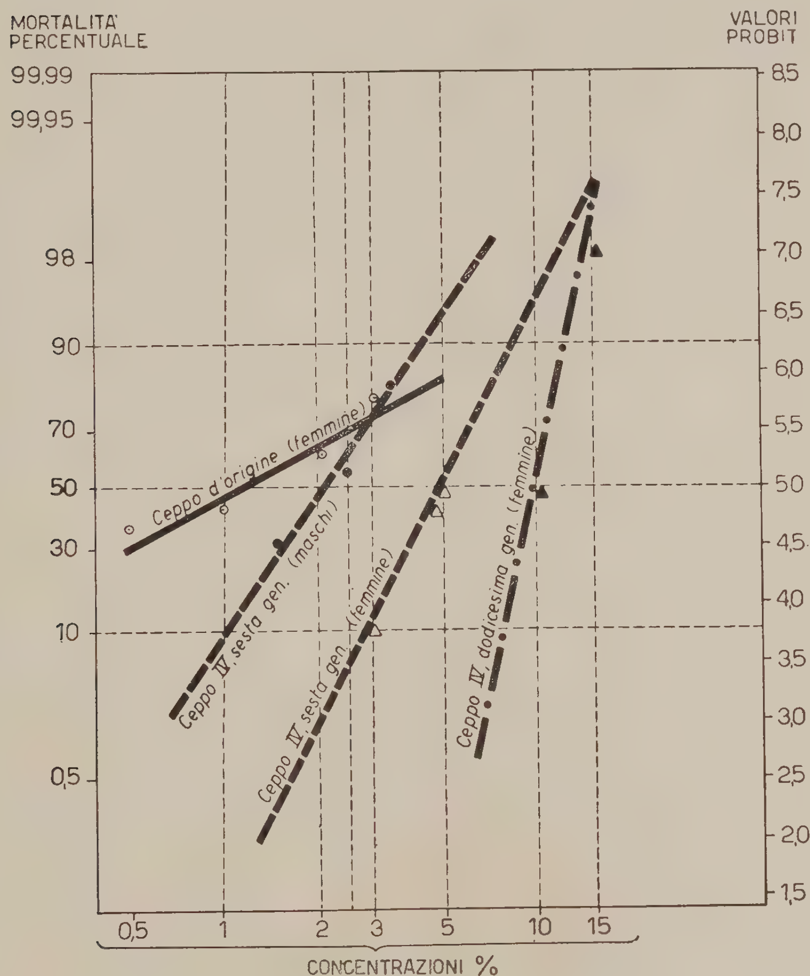


GRAFICO 1

SENSIBILITÀ AL DDT DEL CEPPO ORIGINARIO IMPIEGATO PER GLI ESPERIMENTI.

Allo scopo di determinare la sensibilità media originaria del nostro ceppo di laboratorio, larve ed adulti vennero saggiati di fronte al DDT.

Le larve sono state esposte a varie concentrazioni di DDT in acqua, con le tecniche sopra riferite, mentre larve dello stesso stadio sono state tenute per tempi uguali in acqua contenente solo alcole etilico alle medesime concentrazioni.

La mortalità media osservata su 400 larve di terzo e quarto stadio, sottoposte a ciascuna concentrazione, è rilevabile dalla tabella 1.

Tabella 1.

Mortalità di larve di primo stadio in soluzioni acquose di DDT alla temperatura di 25°C.

Tempo di contatto	Mortalità percentuale alle concentrazioni (in μg per litro)					
	Controllo solo alcole	1 μg/l.	3 μg/l.	10 μg/l.	25 μg/l.	30 μg/l.
24 ore . . .	0	0	0	16	100	100
48 ore . . .	0	0	5	92	—	—

Acquisiti i risultati esposti nella tabella 1 abbiamo determinata la concentrazione massima di DDT sopportabile durante tutta la vita larvale, a partire dalla schiusura dell'uovo e fino allo stadio di pupa.

A questo scopo in sei vaschette, con concentrazioni pari a 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 μg di DDT per litro di acqua rispettivamente, vennero poste a schiudere dodici ovature (circa 200 uova per vaschetta). Fu così possibile stabilire che dalla schiusura dell'uovo fino al 4° stadio, le larve potevano vivere in acqua contenente 3 μg di DDT per litro, subendo una mortalità del 25%.

Sono state inoltre eseguite prove per determinare la mortalità di larve di primo stadio tenute per 15' in acqua, contenente mg 0,5 di DDT per litro, sottoposte, indi, a successivo lavaggio e trasferimento in acqua di fonte. Le prove eseguite su 1300 larve dettero una mortalità di circa il 55% durante le 24 ore successive al trattamento. Prove analoghe su larve di 4° stadio alla concentrazione di mg 0,7 di DDT per litro, fornirono una mortalità del 60% circa.

La LD_{50} per gli adulti venne desunta da prove su oltre 500 femmine ed oltre 100 maschi per ciascuna delle concentrazioni: 0,5 - 1,00 - 2,00 - 3,00%. Essa risultò uguale a 1,6 (vedi graf. 1) per le femmine e non potè essere determinata esattamente per i maschi che subirono una mortalità del 98% di fronte alla concentrazione più bassa (0,5%).

L'esame del grafico fa rilevare una spiccata inclinazione della curva probit-logaritmica; d'altra parte le prove tossicometriche eseguite secondo il metodo di Mariani misero in evidenza che il tempo di contatto necessario per la uccisione del 100% di individui era di 95'.

Queste due costatazioni dimostrano che la sensibilità all'insetticida degli individui del ceppo è notevolmente eterogenea. Deve essere tuttavia rilevato che la dose media letale non si discosta notevolmente dal valore 1% determinato da Warthon (1955) su una popolazione normalmente sensibile di *A. atroparvus.*

Selezione di ceppi resistenti.

Gruppi di individui della popolazione costituente il ceppo originario furono sottoposti a tre diverse modalità di trattamento selettivo. Ciò ha portato alla costituzione di tre ceppi, e cioè:

I ceppo. — Trattamento delle sole larve con mg 0,7 di DDT per litro di acqua, al primo ed al terzo stadio di ciascuna generazione, rispettivamente per 15' e 30'.

II ceppo. — Le uova sono poste a schiudere direttamente in vaschette contenenti 3 μg di DDT per litro di acqua e durante tutta la vita larvale tenute in acqua contaminata dall'insetticida. Ad ogni generazione la concentrazione dell'insetticida è stata aumentata di 1 μg per litro.

III ceppo. — I soli adulti sono stati sottoposti, di generazione in generazione, a selezione di fronte al DDT, a partire dalla concentrazione 2% per le femmine e 1% per i maschi.

TABELLA 2.

Ceppi	LD_{50} sec. Busvine e Nash		% ordinamenti cromosomici	
	femmine	maschi	standard	invertiti + eterozigoti
Originario (non trattato)	1,6 %	0.5 %	79,1	20,9
I (terza generazione)	2,0 %	0,9 %	41,6 %	57,4 %
II (terza generazione)	2,5 %	1,0 %	24,7	57,4
III (terza generazione)	2,5 %	1,0 %	33,0	67,0

Nella tabella 2 sono esposti i valori LD_{50} ottenuti nei ceppi sottoposti a trattamento selettivo. Nella stessa tabella è stata riportata la frequenza degli ordinamenti cromosomici (standard, invertito ed eterozigote) identificati negli individui sia del ceppo originario che dei ceppi selezionati. Quest'ultima indagine si inquadra in nostri studi diretti a stabilire eventuali rapporti fra ordinamenti cromosomici e resistenza al DDT. I dati relativi a queste ricerche sono stati resi noti (D'Alessandro, Frizzi e Mariani, 1957) ed hanno portato alla conclusione che l'ordinamento invertito, sia allo stato omozigote che allo stato eterozigote, è largamente favorito dalla pressione selettiva del DDT.

Tale comportamento è desumibile anche dai dati della tabella 2 la quale mette in evidenza l'esistenza di un rapporto, nel senso sopraindicato, fra frequenza di ordinamenti invertiti e resistenza dei ceppi.

In ogni caso, il grado di resistenza ottenuto nei tre ceppi selezionati è di grado modesto, sia alla 3ª che nelle due successive generazioni. Tale costatazione ci ha indotti a studiare modalità di trattamento selettivo differenti da quelle impiegate per i ceppi I, II e III.

Abiamo, pertanto, sottoposto sia le larve che gli adulti di ciascuna generazione a trattamento con DDT. Il ceppo derivato da tale trattamento è stato denominato IV.

La prima generazione di questo ceppo fu ottenuta incrociando femmine

vergini isolate, superstiti ad un trattamento al 2%, e maschi provenienti dalla quinta generazione del ceppo II, trattato soltanto allo stadio larvale.

Le femmine della F_1, sottoposte allo stesso trattamento (concentrazione 2% che nelle genitrici aveva prodotto una mortalità del 34%, subirono una mortalità del 3,5%; quelle della F_2 subirono una mortalità dell'1,8% e quelle della F_3 una mortalità del 9,1%, sempre di fronte alla medesima concentrazione.

Il contenuto di DDT, nell'acqua impiegata per l'allevamento delle larve del ceppo IV, venne aumentato dapprima di 1 μg per litro ed in seguito di 2 μg per litro, ad ogni generazione.

Il grafico 1 mostra le medie dei valori di sensibilità fra ceppo di origine e generazioni sesta e dodicesima del ceppo IV.

Alla dodicesima generazione, le larve del ceppo IV furono in grado di resistere ad una concentrazione di DDT pari a μg 30 per litro, durante tutta la vita larvale fin dalla schiusura dell'uovo, mentre, come già detto precedentemente (Tab. 1), le larve di primo stadio del ceppo di origine soccombevano entro 24 ore ad una concentrazione di 25 μg per litro.

Osservazioni sul comportamento dei ceppi nel corso dell'allevamento.

1) Una lieve riduzione stagionale di sensibilità è stata osservata in tutti i ceppi durante i mesi di settembre- ottobre. Rilievi del genere sono stati fatti da altri Autori, sia in campo che in ceppi allevati in laboratorio di *A. maculipennis* e di altre specie (de Zulueta e coll., 1957; Gilbert e coll., 1953).

2) come già riferito, gli adulti dei ceppi trattati vengono sottoposti, di generazione in generazione, al contatto con DDT, a distanza di 3 giorni dalla schiusura e circa un'ora dopo il primo pasto di sangue. Ci è stato, così, possibile rilevare che gli individui schiusi per primi sono notevolmente più sensibili degli ultimi schiusi di ciascuna generazione. Non possiamo ancora precisare se tali adulti più resistenti siano provenienti da larve che hanno avuto un più lungo periodo di sviluppo, oppure essi siano provenienti da una seconda o anche da una terza ovodeposizione. Questa seconda ipotesi sembra la più verosimile e potrebbe significare che gli adulti più resistenti sono prole di femmine longeve e pertanto suscettibili di dare un maggior numero di ovodeposizioni.

3) Il ceppo d'origine ha mostrato, dopo un anno di allevamento in laboratorio, una lieve riduzione di sensibilità. Infatti la LD_{50} che per le femmine di tale ceppo era all'inizio uguale a 1,6 è attualmente uguale ad 1,9.

Osservazioni citogenetiche sul ceppo resistente (IV).

In altra memoria (D'Alessandro, Frizzi e Mariani, 1958) abbiamo comunicato i risultati dell'analisi comparativa citogenetica del ceppo d'origine e del ceppo IV. Tale ricerca pose in evidenza, a conferma di precedenti nostre osser-

vazioni, una notevole differenza fra i due ceppi; infatti la frequenza di individui contrassegnati da inversione, allo stato emozigote ed eterozigote, fu del 20,9% nel ceppo non trattato e del 78,29% nel ceppo IV alla dodicesima generazione.

L'estensione di queste indagini ci ha portato ad una constatazione di qualche interesse ed in apparenza contrastante con quanto già osservato. Infatti, procedendo all'esame citogenetico di adulti sopravvissuti ad intensa esposizione all'insetticida, capace, cioè, di produrre una mortalità di oltre il 90%, risultò che alcuni di essi (circa il 20% della popolazione residuale) presentavano ordinamento standard.

OTTENIMENTO DI UN CEPPO AD ORDINAMENTO STANDARD.

In presenza di questo risultato ci è sembrato opportuno indagare ulteriormente sulla natura e caratteristica della resistenza al DDT in individui ad ordinamento omozigote standard. Ci siamo proposti, pertanto, di ottenere un ceppo standard puro e di ricercare se l'impiego di pressione selettiva di DDT portasse in esso, come verificatosi in ceppi ad ordinamenti cromosomici eterogenei, al selezionarsi di individui forniti di resistenza.

Possediamo ora un ceppo « puro », nel senso che esso è costituito soltanto da individui ad ordinamento standard.

Siamo pervenuti a tale risultato operando come segue:

a) isolamento di ovodeposizioni singole nel ceppo originario ed allevamento isolato delle larve di ciascuna ovodeposizione;

b) esame citogenetico del 50% delle larve di 4° stadio ottenute da ciascuna ovodeposizione;

c) separazione delle larve derivanti da ciascuna ovodeposizione, delle quali il 50% era risultato ad ordinamento standard e loro allevamento.

Da questo ceppo, con le medesime tecniche impiegate per il ceppo IV, è in corso la selezione di fronte al DDT di altro ceppo (V) attualmente alla sua 3ª generazione.

Le ricerche comparative sulla sensibilità offerta dal ceppo originario, dal ceppo ad ordinamento standard e dal ceppo da quest'ultimo derivato per trattamento selettivo sono in corso. I primi dati preliminari ottenuti dimostrerebbero una maggiore resistenza del ceppo selezionato (V) in confronto al ceppo originario.

* * *

Le ricerche consegnate nella presente nota permettono alcune deduzioni conclusive:

1) la insorgenza della resistenza attraverso pressioni selettive esercitate su soli adulti o su sole larve, è lenta e il grado di resistenza raggiunto modesto;

2) a conferma di precedenti esperimenti è dimostrato che nella selezione di fronte al DDT, di un ceppo costituito da individui a diverso ordinamento cromosomico, è favorito l'ordinamento portante la inversione di un tratto del braccio sinistro del 3° cromosomo, particolarmente allo stato eterozigote;

3) dall'incrocio fra femmine sopravvissute ad un singolo trattamento selettivo con DDT e maschi provenienti da larve selezionate per allevamento in presenza di DDT, si ha rapida insorgenza di resistenza di grado notevole.

4) Un lieve aumento stagionale della resistenza è stato verificato nei ceppi in studio in corrispondenza del periodo di pre-ibernazione, ciò malgrado l'allevamento fosse mantenuto a temperatura praticamente costante.

5) Fra gli adulti di ogni generazione, quelli schiusi per primi sono più sensibili al paragone degli ultimi. E' probabile che questi individui più resistenti derivino da femmine più longeve e pertanto capaci di dare una seconda e probabilmente una terza ovodeposizione.

6) anche negli individui di un ceppo ad ordinamento cromosomico standard la sensibilità al DDT non è omogenea. Il trattamento selettivo di tale ceppo, attualmente in corso, sembra fornire individui progressivamente più resistenti.

Appare, ora opportuno sottolineare come, fra i metodi selettivi impiegati, quello più efficace, nel senso di provocare una più rapida e significativa resistenza, sia il procedimento che impiega una pressione selettiva di DDT su tutti gli stadi dell'insetto. Deve essere anche menzionato che alla tredicesima generazione il grado di resistenza manifestatosi nel ceppo in seguito a tale trattamento sarebbe di per sè sufficiente a rendere inefficaci le irrorazioni con DDT negli ambienti secondo le modalità attualmente seguite. Appare anche evidente che tale grado di resistenza non può rientrare nella così detta «vigor tolerance» di Hoskins e Gordon (1956) e ciò prescindendo, per il momento, da considerazioni che riguardano l'intima essenza di questo fenomeno e la possibilità di netta separazione dalla così detta «resistenza vera».

E' chiaro ancora che lo sviluppo della resistenza al DDT negli Anofelini, in condizioni naturali, è legato al diverso comportamento dei due sessi. Infatti è poco probabile il selezionarsi di maschi resistenti per esposizione a superfici domestiche trattate e ciò per il fatto che questi ultimi, a parte la loro maggior sensibilità all'insetticida, penetrano soltanto occasionalmente nelle abitazioni. Tale condizione fa apparire prevedibile che l'insorgenza della resistenza nelle popolazioni anofeliniche sia legata al trattamento o contaminazione dei focolai larvali con DDT o altri insetticidi di sintesi con selezione di maschi sufficientemente resistenti affinchè l'incrocio con femmine selezionate da superfici trattate dia una prole resistente.

A questa supposizione, generalmente ritenuta valida, conferiscono attendi-

bilità i risultati delle indagini che hanno portato al costituirsi del nostro ceppo IV.

Va infine rilevato che la ricerca citogenetica sulle popolazioni dei ceppi trattati può fornire dati di notevole valore nella comprensione dei fenomeni che presiedono al selezionarsi di ceppi resistenti.

Dalle presenti come dalle precedenti indagini è risultato che in una popolazione eterogenea, sia per sensibilità che per ordinamenti cromosomici, una pressione selettiva di DDT favorisce un particolare ordinamento e che l'aumento di frequenza di tale ordinamento è significativamente correlato all'aumento di resistenza.

Ma la complessità dei fenomeni ora considerati appare chiaramente espressa dal fatto che una pressione selettiva esercitata su un ceppo omogeneo per ordinamento cromosomico (standard) sembra pure portare ad una popolazione fornita di aumentata resistenza.

I risultati degli studi attualmente in corso su questo punto sono da noi attesi non senza interesse. Infatti, se dal ceppo in parola, ad ordinamento standard, fosse possibile ottenere individui ad alto livello di resistenza, avremmo in ciò un ulteriore elemento utile ai fini della alternativa di monofattorialità o polifattorialità nella genesi della resistenza in *Anopheles atroparvus*.

RIASSUNTO

Gli Autori riferiscono i risultati di esperimenti di selezione per pressione di DDT fatta agire su soli adulti, su sole larve e su larve ed adulti di *A. atroparvus*.

E' stato messo in evidenza che è possibile ottenere un rapido e significativo aumento di resistenza incrociando femmine adulte, selezionate per esposizione a superfici trattate, con maschi derivanti da larve allevate in presenza dell'insetticida e superstiti da tale trattamento.

Vengono inoltre riferite alcune osservazioni sulla biologia di *A. atroparvus* allevato in laboratorio e particolarmente: variazioni stagionali di sensibilità all'insetticida ed in rapporto all'ordine di schiusura degli adulti di ciascuna generazione.

Si fa, infine, menzione delle relazioni esistenti fra ordinamenti cromosomici delle popolazioni trattate e resistenza al DDT: i risultati confermano che nella pressione selettiva da DDT è spiccatamente favorito l'ordinamento cromosomico invertito, sia allo stato omozigote che eterozigote .Si accenna ai primi dati forniti dallo studio del comportamento di un ceppo ottenuto in forma pura (omozigote standard) nei riguardi della pressione selettiva con DDT.

SUMMARY

Results of selection experiments in which DDT-pressure was exerted on adults only, on larvae only, and on larvae as well as on adults of *Anopheles atroparvus*, are reported.

It was shown, that it is possible to achieve a rapid and significant increase in resistance by crossing adult females, selectioned by exposition to insecticide treated

surfaces, with males deriving from larvae raised in presence of the insecticide and surviving such a treatment.

Some observations on the biology of laboratory raised *A. atroparvus* are recorded, especially concerning seasonal variations of insecticide susceptibility and on the relation between order of hatching of adults and insecticide-susceptibility in each generation.

Finally, the relations between chromosomal arrangement of the treated populations and DDT-resistance are mentioned. The results confirm that by DDT-selection pressure the inverted chromosomal rearrangements are favoured in the homozygous as well as in the heterozygous state. There are recorded first data fornished by the study on the behaviour of a strain obtained in pure form (homozygous standard) as regards DDT-selection pressure.

BIBLIOGRAFIA

BUSVINE J. R. e NASH R. (1953): Evaluation of new contact insecticides - *Bull. Ent. Res.*, *44*, 371.

D'ALESSANDRO G. e MARIANI M. (1953): Indagini sull'azione degli insetticidi clorurati e sui fenomeni di resistenza della *M. domestica*. - *Igiene e Sanità Pubblica*, *9*, 706-711.

D'ALESSANDRO G., FRIZZI G. e MARIANI M. (1956): Effect of DDT selection pressure on the frequency of chromosomal structures in *A. atroparvus*. *Bull.. Org. Mond. Santé 16*, 859-864.

D'ALESSANDRO G., FRIZZI G. e MARIANI M. (1958): Ulteriori osservazioni sui rapporti fra ordinamenti cromosomici e resistenza al DDT in *A. atroparvus*. *Riv. Parass. 19*, 1.

FRIZZI F. (1953): Studio citogenetico degli *Anopheles maculipennis* in Italia. *Bull. Org. Mond. Santé*, *9*, 355-344.

GILBERT H. I. e Coll. (1953): Development of resistance to insecticides in natural population of house flies - *J. Econ. Ent.*, *46*, 448.

HOSKINS W. M. e GORDON H. T. (1956): Arthropod resistance to Chemical - *Annual Rev. of Entomol.*, *1*, 89-122.

MARIANI M. (1954): Ancora sui procedimenti tossicometrici per la valutazione biologica degli insetticidi. *Boll. Soc. Ent. Ital.*, *84*, 67-71.

MARIANI M. (1955): Tecniche per l'allevamento sperimentale e per la dissenzione di insetti ed altri artopodi di interesse Medico-Igienistico. *Boll. Soc. Entom Ital.*, *85*, 12-19; 130-138.

MARIANI M. (1956): Sulla sensibilità dell'*Anopheles labranchiae* al DDT dopo sette anni di lotta antianofelica con insetticidi clorurati in Sicilia. *Riv. Parass.*, *17*, 171-176.

MARIANI M. e BRUNO SMIRAGLIA C. (1957): Presenza di cromosomi politenici nelle cellule vitellogene degli ovari di femmine adulte di *Anopheles*. *Boll. Soc. Ent. Ital.*, *87*, 23-25

REED L. J. e MUENCH H. A. (1938): A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, *27*, 493-497.

WARTHON L. H. - *Bull. Ent. Res.* (citato da BUSVINE).

ZULUETA (de) J., JOLIVET P., THIMAKIS e CAPRARI P. (1957): Seasonal variation in susceptibility to DDT of *A. maculipennis* in Iran. *Bull. Org. Mond. Santé*, *16*, 476-479.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 3 Luglio 1958

NOTE E OSSERVAZIONI

SULLA LETALITA' LARVALE IN CEPPI DI *CULEX MOLESTUS* FORSKAL (*)

E' noto che la specie linneana *Culex pipiens* rappresenta, come ha messo in luce per primo E. ROUBAUD, due tipi principali ai quali viene attribuito il valore di specie distinte e cioè il *C. pipiens* Linn. e il *C. molestus* Forskäl. Questa ultima forma fu indicata dapprima da ROUBAUD come *C. pipiens* var. *autogenicus* e più tardi, dal medesimo Autore, come *C. pipiens* var. *berbericus*. I caratteri morfologici distintivi del *C. pipiens* e del *C. molestus* non sono ben netti e non sono tali da essere utilizzati per una rapida ed esatta distinzione delle due specie, le quali presentano, però, marcate differenze di ordine fisiologico. Il *C. pipiens* Linn. è stato definito dal ROUBAUD come specie anautogena, incapace cioè di maturare le uova senza un pasto di sangue: eurigama, perchè la fecondazione si effettua solo in uno spazio sufficientemente ampio: eterodinama, cioè, soggetta ad una pausa ciclica obbligatoria durante il suo ciclo vitale. Per ciò che riguarda le preferenze alimentari il *C. pipiens* è particolarmente orientato verso gli uccelli.

Il *C. molestus* Forskäl (*C. autogenicus* di ROUBAUD) è invece specie autogena, poichè in essa la prima ovodeposizione può effettuarsi senza essere preceduta dall'assunzione di sangue o di altro alimento, potendo la femmina adulta utilizzare per la maturazione delle uova le riserve proteiche accumulate durante la fase larvale, fase che si compie frequentemente in acque luride cariche di residui azotati, come sono quelle delle fogne, o in qualsiasi altro ambiente idrico ricco di residui organici. Un pasto di sangue sembra, però, necessario per le ovodeposizioni successive alla prima.

Il *C. molestus*, è, inoltre, specie stenogama, poichè l'incontro fra i due sessi può effettuarsi in spazi ristretti come quelli rappresentati dalle comuni gabbiette che si usano negli allevamenti di laboratorio.

E' infine specie omodinama poichè non è soggetta ad un vero ibernamento durante il suo ciclo di sviluppo, ma soltanto rallenta la sua attività se la temperatura dell'ambiente si abbassa al di sotto di certi limiti. In quanto ai cibi ricercati, può dirsi che la specie sia manifestamente orientata verso i mammiferi.

Il *C. pipiens* var. *berbericus* è anautogeno, steno-eurigamo poichè, se è possibile ottenere uova fertili in gabbie di 1/10 di metro cubo, la fecondazione si effettua difficilmente in spazi ristretti. Il *berbericus* è infine omodinamo e nettamente antropofilo.

(*) Il lavoro è stato eseguito presso il Centro di Studi per la Lotta contro gli Insetti Nocivi.

Viene ammesso generalmente che tanto nel *pipiens* quanto nel *molestus* possano essere compresi più biotipi che si differenziano per caratteri biologici e che possono incrociarsi tra loro dando origine a forme ibride con caratteri intermedi, donde la grande eterogeneità biologica che si riscontra nelle popolazioni costituenti il complesso. Esisterebbe nondimeno un limite alla capacità d'incrocio rappresentato da fenomeni di amissia fisiologica consistente in una sterilità che colpisce le uova di origine ibrida, e nella comparsa di larve letali. Una parte delle uova deposte dalla femmina di origine ibrida non si sviluppa o per mancata fecondazione o per l'intervento di fattori che arrestano lo sviluppo embrionale. Sono queste le così dette uova «bloccate». Osservando inoltre le uova dopo qualche giorno dalla deposizione, si nota che un certo numero di larve (larve letali) muoiono nell'interno del corion, senza riuscire a completare il loro sviluppo. Mediante azioni chimiche e meccaniche è possibile provocare la schiusa delle larve colpite da letalità, ma la loro evoluzione si arresta dopo poco tempo. Questa incapacità ad un'effettiva riattivazione differenzia le larve letali di *Culex* dalle larve in diapausa nell'uovo che si osservano in alcune specie di *Aëdes*.

I fenomeni ai quali si è accennato, osservati dapprima da E. Roubaud, furono notati anche da altri (G. F. Marshall, E. Ulman).

La presenza di larve letali in ceppi, naturali o artificiali, sia di *pipiens* che di *molestus* non è dovuta secondo Roubaud ad azioni esterne come potrebbero essere l'alimentazione o anche l'invecchiamento dei ceppi stessi, ma avrebbe il significato di un'incompatibilità fisiologica fra genotipi diversi del complesso «*pipiens*» manifestantesi negli incroci fra essi. La costanza con cui si osserva il fenomeno indicherebbe l'estrema rarità con cui è possibile rinvenire in natura ceppi geneticamente puri delle due forme suddette, la cui esistenza sarebbe limitata in regioni molto circoscritte geograficamente.

Tabella 1.

Ceppo: 1G - Località: S. Felice Circeo - Ambiente di sviluppo: Pozzo freatico.

Generazioni	n° deposizioni	n° totale uova deposte	n° medio uova per deposizione	n° totale uova schiuse	n° medio uova schiuse per deposizione	n° totale uova bloccate	n° medio uova bloccate per deposizione	n° totale larve letali	indice di letalità
G 1 . .	4	243	60,75	230	57,50	13	3,25	0	0
G 2 . .	4	236	59,00	207	51,75	29	7,25	0	0
G 3 . .	17	1073	63,12	828	48,71	245	14,41	0	0
G 4 . .	12	586	48,83	428	35,67	130	10,83	28 (1)	0,04
G 5 . .	7	329	47,00	202	28,86	88	12,57	39 (2)	0,11
G 6 . .	31	2114	68,19	2048	66,06	60	1,94	6 (3)	0,002
G 7 . .	24	1339	55,79	1208	50,33	59	2,46	72 (4)	0,05
G 8 . .	18	1596	88,67	1413	78,37	137	7,61	46 (5)	0,02
G 9 . .	15	926	61,73	837	55,80	71	4,73	18 (6)	0,01
G 10 . .	21	1576	75,05	1527	72,71	29	1,38	20 (7)	0,01

1) Presenti in 8 deposizioni, in n. da 1 a 9; 2) Presenti in 5 deposizioni, in n. da 1 a 18; 3) Presenti in 3 deposizioni, in n. da 1 a 4; 4) Presenti in 17 deposizioni, in n. da 1 a 13; 5) Presenti in 9 deposizioni, in n. da 1 a 9; 6) Presenti in 6 deposizioni, in n. da 1 a 7; 7) Presenti in 11 deposizioni, in n. da 1 a 4.

Avendo preso in esame da qualche tempo le popolazioni di *Culex molestus* in una zona circoscritta rappresentata dal territorio di San Felice Circeo (Prov. di Latina) si è ritenuto utile verificare se dalla frequenza delle larve letali si potesse avere qualche indicazione circa l'esistenza o l'assenza di ceppi genotipicamente puri della specie in questione nella suddetta regione. Da femmine provenienti da larve di due focolai diversi della regione su nominata riferibili al *C. molestus* in base ai caratteri fisiologici osservati in laboratorio ,si sono ottenuti nell'insettario dell'Istituto Superiore di Sanità due ceppi indicati nei protocolli come ceppi 1g e ceppo 2. Il ceppo 1g è derivato da un'unica ovodeposizione ottenuta da una delle femmine allevate da larve rinvenute in un pozzo freatico situato a poca distanza dalla spiaggia di San Felice Circeo. Il ceppo 2 deriva invece da due ovodeposizioni, che non furono isolate, da due femmine allevate da larve raccolte nell'acqua di una fossa già adibita a preparazione di calce spenta e in cui si era raccolta, dopo, una certa quantità di acqua piovana. I due ceppi sono stati allevati nelle stesse condizioni ambientali, alla temperatura media di 27°C. e una umidità relativa di 70°. Le larve furono allevate in acqua di fonte contenuta in recipienti di terra cotta della capacità di circa due litri e rinnovata ogni due giorni. L'alimento larvale consisteva in cruschello di farina di grano. Gli individui alati venivano collocati in piccole gabbie di legno e tulle delle dimensioni di cm. 12 × 9, nelle quali si verificano la fecondazione e la deposizione delle uova. Le osservazioni riferentisi alla comparsa delle larve letali furono prolungate, in ciascun ceppo, per dieci generazioni che si svolsero tra il luglio del 1955 e il gennaio del 1956,

TABELLA 2.

Ceppo: 2 - Località: S. Felice Circeo - Ambiente di sviluppo: Fossa già occupata da calce spenta.

Generazioni	n° deposizioni	n° totale uova deposte	n° medio uova per deposizione	n° totale uova schiuse	n° medio uova schiuse per deposizione	n° totale uova bloccate	n° medio uova bloccate per deposizione	n° totale larve letali	indice di letalità
G 1 . .	8	565	70,63	395	49,38	170	21,25	0	0
G 2 . .	8	538	67,25	382	47,75	156	19,50	0	0
G 3 . .	23	1480	64,35	1091	47,43	381	16,57	8 (1)	0,005
G 4 . .	20	708	35,4	533	26,65	112	5,60	63 (2)	0,08
G 5 . .	31	1922	62,00	1622	52,32	226	7,29	74 (3)	0,03
G 6 . .	32	2172	67,88	1025	32,03	1102	34,43	45 (4)	0,02
G 7 . .	21	1364	64,95	1164	55,43	157	7,48	43 (5)	0,03
G 8 . .	11	921	83,73	815	74,09	67	6,09	39 (6)	0,04
G 9 . .	20	1369	68,45	1027	50,14	243	12,2	99 (7)	0,07
G 10 . .	19	1526	80,32	1419	74,68	68	3,58	39 (8)	0,02

1) Tutte appartenenti ad una deposizione; 2) Presenti in 13 deposizioni, in n. da 1 a 17; 3) Presenti in 18 deposizioni, in n. da 1 a 11; 4) Presenti in 10 deposizioni, in n. da 2 a 11; 5) Presenti in 11 deposizioni, in n. da 1 a 9; 6) Presenti in 8 deposizioni in n. da 2 a 9; 7) Presenti in 11 deposizioni, in n. da 1 a 31; 8) Presenti in 12 deposozioni, in n. da 1 a 10.

cioè per circa sette mesi. Gli esami delle singole ovodeposizioni e relativo conteggio delle uova schiuse e di quelle «bloccate» e di quelle contenenti larve letali sono stati fatti dopo sette giorni dalla schiusura, tranne che per quelle della prima e seconda generazione in cui l'esame fu fatto dopo quattro giorni.

I dati raccolti sono esposti nelle tabelle 1 e 2.

Dall'esame delle tabelle risulta la presenza di larve letali nei ceppi studiati che, accettando la teoria del ROUBAUD, indicherebbe che non sono geneticamente pure, e risulta anche una certa variabilità dell'indice di letalità nelle successive generazioni di entrambi i ceppi. Tale variabilità induce a pensare che la letalità larvale, pur essendo espressione di un fenomeno alla cui base sta una incompatibilità fisiologica legata alla particolare costituzione genetica di biotipi eterogenei capaci di incrocio, dipenda anche da fattori che esercitano la loro azione nell'ambiente genetico interno e forse anche di fattori esterni.

Questa supposizione è avvalorata dal fatto che nell'allevamento di laboratorio la letalità larvale non si è manifestata in ciascuno dei due ceppi osservati, nelle prime generazioni, ma nelle successive, in coincidenza probabilmente dell'intervento di tali fattori.

Maggior luce sull'argomento potrà forse derivare da ulteriori ricerche che sono in corso e dal risultato degli incroci tra i due ceppi su cui si è riferito.

PIERO CAPONE BRAGA
Istituto Superiore di Sanità
Laboratorio di Parassitologia, Roma

BIBLIOGRAFIA

1) MARSHALL G. F. and STANLEY G. (1937): Some notes regarding the morphological and biological differentiation of *Culex pipiens* Linn. and *Culex molestus* Forskäl. *Proc. R. Entom. Soc. London, 12*, 17.

2) ROUBAUD E. (1941): Phénomène d'amixie dans les intercroissement de Culicides du groupe *pipiens. C. R. Acad. Sc. 212*, 257-259.

3) ULMAN E. (1941): Die regulatorische Bedentung der Bevölkerungsdichte für das naturliche Gleichgevicht einer Arte. *Zeit Ang. Entom. 28*, 1-180.

4) ROUBAUD E. (1954): Les larves lethales et leur signification dans le complex *Culex pipiens, Riv. di Parass. XV*, 621-638.

INSECTICIDAL PROPERTIES OF N-SUBSTITUTED FLUOROACETAMIDES

In 1956, the author had occasion to test fluoroacetamide and a series of N-substituted fluoroacetamides prepared at the Laboratories of the Research Council of Israel, Jerusalem (1) as to their residual contact toxicity against highly DDT-resistant houseflies. Some of these data are mentioned in fragmentary form in a recent paper by BERGMANN *et al.* (2).

Recentely, attention has been drawn to the effectiveness of fluoroacetamide as *systemic* insecticide (3), (4). Since it has been affirmed (3), however, that though fluoroacetamide had been stated (5), (6) to be an active insecticide, there were no published details of biological tests, the author deemed it of significant interest to present herewith the full data of his findings in 1956.

Experimental: The tests were done with the purpose of evaluating fluoroacetamide and its derivatives as to their potentialities of practical *contact* insecticides. Therefore, 2 - 3 days old females of a highly DDT-resistant strain (R) of *Musca vicina*, fed water and sugar only, were exposed to one day old deposits (1 g/sq.m.) in Petri dishes (from acetone solutions). Crystallization of the deposits was insured in the manner previously described (7). Contact time was 2 hours (8), observations being taken after 10, 20, 30, 60, 90 and 120 minutes. Results were summed up in form of Σ %k.d. (9). In each experiment there were used 4 x 10 flies, the active compounds being retested.

The properties of strain R were characterized by observing its response to deposits (0.25 g/sq.m.) of some common insecticides. The deposits tested were 1, 7, 14, 21 and 28 days old.

Results: The following N-substituted fluoroacetamides were tested. Physical properties of the compounds may be found in BERGMANN *et al.* (2).


$FCH_2.CO.NRR'$

No.	*R*	*R'*	
I	H	H	fluoroacetamide
II	*iso*-butyl	H	
III	*cyclo*-hexyl	H	
IV	phenyl	H	
V	*p*-tolyl	H	
VI	*p*-methoxyphenyl	H	
VII	*p*-fluorophenyl	H	
VIII	*p*-chlorophenyl	H	
IX	*p*-bromophenyl	H	
X	*p*-diphenylyl	H	
XI	alpha-naphthyl	H	
XII	beta-naphthyl	H	
XIII	alpha-pyridyl	H	
XIV	*n*-propyl	*n*-propyl	
XV	*n*-butyl	*n*-butyl	
XVI	*iso*-amyl	*iso*-amyl	
XVII	NRR' = piperidino		
XVIII	NRR' = morpholino		

Only compounds IV, V, VI, VII, VIII and XVI brought about any k.d. within 2 hours of exposure (Table 1). The rest of the compounds were inactive according to this test method.

TABLE 1.

(1 *g/sq.m., on glass; age of deposits - 1 day; T = 27°C*)
%k.d.

Minutes	IV		V		VI		VII		VIII		XVI	
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12	—
60	—	5	—	—	—	—	5	5	2	—	20	15
90	32	30	17	10	—	2	37	17	17	24	20	25
120	60	57	57	62	40	32	95	82	52	50	20	25
Σ %k.d.	92	92	74	72	40	34	137	104	71	74	72	65

The active compounds are thus in the N-monosubstituted series the phenyl and *para* substituted phenyl compounds, which seem to possess some liposolubility (with the exception of *p*-bromophenyl fluoroacetamide). In the NN-dialkyl series, it is only at the di-*iso*-pentyl derivative, that some liposolubility is conferred to the molecule. Since most residual contact insecticides, (10), lie within the range of molecular weight 270 - 430, the slightly active compounds found have too low molecular weights. Contact insecticides might be found, if the dialkyl series would be continued to members within the aforesaid range of molecular weights; the NN-disubstituted series should also be extended in the direction of R = R' = phenyl and *p*-substituted phenyl radicals.

TABLE 2.

(0.25 *g/sq.m., on glass; T = 27°C; results espressed in Σ%k.d. only*).

Insecticide	Age of deposit in days				
	1	7	14	21	28
Gamma BHC	248	139	0	6	0
Dieldrin	317	34	0	0	4
DDT	0	0	0	5	0
Chlordane	64	27	0	0	0
Toxaphene	10	14	0	0	0
Diazinon	600	279	0	0	0
Malathion	519	564	437	374	364
Untreated Control	0	0	0	0	0

In Table 2, the properties of strain R may be seen. Comparison of Table 1 and 2 makes it evident, that the compounds tested so far in the fluoroacetamide series are rather weak contact poisons for resistant houseflies.

K. R. S. Ascher (*)

BIBLIOGRAPHY

(1) Bergmann E. D. *et al.* (1956): *Bull. Research Council Israel 5A*, 304.

(2) Bergmann E. D. *et al.* (1957): *J. Sci. Fd. Agric. 8*, 400,

(3) David W. A. L. and. Gardiner B. O. C. (1958): *Nature 181*, 1810.

(4) Chapman C. and Phillips M. A. (1958): *Nature 181*, 1810.

(5) Phillips M. A. (1955): *World Crops* 7, 480.

(6) Phillips M. A. (1957): *Chemical Age* 77, 673.

(7) Reuter S. and Ascher K. R. S. (1956): *Experientia 12*, 316.

(8) Kocher C. *et al.* (1953): *Anz. Schädlingsk. 26*, 65.

(9) Kocher C. *et al.* (1954): Information of the Pest Control Department, J. R. Geigy S. A., Basle, 01B/Ko/RT/ct - 8 pages, issued on 14.10.1954.

(10) Riemschneider R. (1956): *Z. ang. Ent. 38*, 105.

(*) Present address: *Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Parassitologia, Roma.*

RECENSIONI

BLACKLOK D. B. and SOUTHWELL T. - *A Guide to Human Parasitology for Medical Practitioners.* 6ª Ed., revised by T. H. DAVEY, VIII+22 pp., 119 figg., 3 tavv. a colori. H. K. Lewis & Co., London, 1958, Lst. 1.10.0.

Questa 6ª edizione non presenta sostanziali modifiche nei confronti della precedente (v. per la recensione su questa Rivista, XV, 1953, pag. 63): aggiunte, soppressioni e cambiamenti hanno tuttavia oculatamente mirato a rendere sempre più funzionale il libro per i fini pratici — informazione concisa e rapida su ogni aspetto essenziale della parassitologia medica — per cui è stato scritto.

Tra le aggiunte ricorderemo: un metodo di concentrazione delle cisti di protozoi nelle feci, la breve trattazione di *Isospora* e *Toxoplasma*, un metodo per la stima quantitativa delle uova di anchilostomi nelle feci. Tra le soppressioni: quella del capitolo sull'infezione congenita e immunità, delle tabelle sui sinonimi delle spirochete, sulle differenze tra *D. latum* e *T. saginata*, della chiave delle specie di nematodi parassiti dell'uomo, delle proposte cause della periodicità delle microfilarie. Quanto ai cambiamenti, noteremo: la sostituzione della tabella diagnostica di *E. histolytica* con una sulle principali differenze tra la stessa *E. histolytica* ed *E. coli;* il rimaneggiamento della trattazione di *T. gambiense;* la mutata disposizione, ora essendo stati raggruppati a seconda delle vie di ingresso nel corpo umano, dei diagrammi dei cicli biologici dei vari parassiti.

M. RICCI

BUSVINE J. R. - *A critical Review of the Technique for Testing Insecticides.* pp. 208, fig. 46. Commonwealth Inst. Entomology, London, 1957. sh./30.

L'Autore ci ha fornito un manuale di grande praticità e di cui da tempo si sentiva la mancanza nei laboratori di tossicologia degli insetti. Questo volume ha il gran pregio di essere stato preparato da persona che ha lungamente lavorato in questo campo e che, come tale, ha potuto presentare, egregiamente, come esperto e come critico, la vasta materia. Difatti, ben vasto è questo ramo dell'entomologia, che ha avuto nuovo impulso dopo l'avvento degli insetticidi di sintesi: circa 550 citazioni bibliografiche sono elencate dall'Autore che ha svolto un lavoro non indifferente per mantenere in uno spazio limitato la rassegna di sì vasta letteratura.

Il volume contiene tutti i metodi di uso corrente per la determinazione della tossicità delle sostanze insetticide o repellenti e comprende la trattazione sia degli insetti di interesse medico-veterinario che di quelli nocivi all'agricoltura ai quali ultimi sono dedicati i « tests » sui veleni per ingestione e sui sistemici.

Molto chiare le figure schematiche che arricchiscono il testo e che sono di notevole ausilio al lettore.

Il volume comprende in distinti capitoli i seguenti argomenti: principi generali

sulle prove biologiche con gli insetticidi e come maneggiare gli insetti ai fini delle prove stesse; « standardizzazione degli insetti » per le prove, suddiviso in due parti: sostanze insetticide e repellenti, ciascuna delle quali a sua volta comprende due sezioni: fattori intrinseci (specificità di gruppo, di specie e di stadio, sesso, dimensioni) e fattori estrinseci (temperatura, umidità, cibo, densità di popolazioni, illuminazione; insetticidi per ingestione, comprendente i veleni in polvere, liquidi e gli insetticidi sistematici; polveri insetticide di contatto e metodi di immersione (per insetti terrestri e per larve di zanzare); apparecchi d'irrorazione per laboratorio ed apparecchi per l'applicazione di insetticidi ai singoli insetti; esposizione di insetti a superfici trattate con insetticidi di contatto; fumiganti; repellenti. Chiude il volume un esauriente capitolo sulla statistica tossicologica, molto utile e chiaramente presentato.

Un particolare interesse dell'opera è dato dal fatto che in essa sono contenute le norme per una standardizzazione razionale dei metodi di determinazione della tossicità di prodotti verso gli insetti; di essi, infatti, si ha urgente bisogno in questo campo ove purtroppo i risultati dei diversi autori sono raramente paragonabili.

Ci si può domandare perchè l'Autore non abbia incluso nell'opera quei metodi di fisiologia applicata e di biochimica che vengono impiegati in alcuni casi per la valutazione della azione tossica degli insetticidi. E' indubbio che questo manuale ha fini eminentemente pratici. La pubblicazione recente di un volume redatto da un gruppo di Autori americani forse soddisferà tale richiesta.

Il volume è indispensabile per l'entomologo applicato e la diffusione dell'opera è auspicabile. L'Autore non può essere che elogiato per il lavoro compiuto.

S. Bettini

Policard A., Bessis M., Locquin M. - *Traité de Microscopie. Instruments et Techniques*, VI + 608 pp., 178 figg. Masson & C.ie, Paris 1957, Fr. 5.200.

Alla microscopia classica, quella cioè che utilizza la luce visibile, si è venuta, come noto, aggiungendo nel corso dell'ultimo ventennio, quale esito dell'aspirazione ad approfondire sempre più i limiti delle nostre conoscenze nell'ambito delle più piccole forme di organizzazione della materia e a perfezionare quelle acquisite, tutta una serie di forme speciali di microscopia — da quella a contrasto di fase, alla polarizzante, alla fluorescente, alla elettronica, ecc. — che hanno ovviamente portato alla creazione di numerosissime nuove tecniche di osservazione e metodi di preparazione. Tecniche e metodi che aggiungendosi a quelli già essi stessi così numerosi, tra vecchi e nuovi, della microscopia classica hanno reso la microscopia una scienza così ricca di dati da non potersi praticamente più pensare alla loro globale riunione nello spazio di un semplice libro.

L'opera, che siamo lieti di presentare sicuri che ad essa arriderà il migliore successo, grazie ad una opportuna scelta della materia, mette il lettore in condizione di farsi una compiuta idea di quelle che sono le possibilità della microscopia oggi, erudendolo sugli strumenti, ben spiegati sia nella loro meccanica che nei principi fisici cui si informano, sulle loro possibilità come mezzi di indagine, nonchè sui metodi. In particolare gli AA., nella ovvia impossibilità di ricordare ogni tecnica e metodo, si sono assai lodevolmente sforzati di dare notizia quanto più precisa possibile di ogni elemento della materia che costituisse un « principio ».

Il libro non è tuttavia di sola cultura teorica, ma bensì anche di utilizzazione pratica: esso contiene infatti anche tutte quelle indicazioni che portano ad un corretto uso dello strumento microscopico, sia per quanto si riferisce agli strumenti che per quanto attiene alle tecniche. Appunto in queste due parti « Gli strumenti » ed « I metodi » è divisa l'opera. Dei 5 capitoli della prima parte uno è dedicato ai principi fondamentali della microscopia, un secondo al microscopio classico, il terzo alle tecniche ed ai microscopi speciali, il quarto alla registrazione delle immagini

e l'ultimo alla microscopia elettronica. La seconda parte è divisa in 14 capitoli e ripete in parte, necessariamente, lo schema di trattazione di ogni libro di tecnica microscopica: dall'esame a fresco, alle fissazioni, inclusioni, colorazioni, montaggio; dalle impregnazioni metalliche ai metodi istochimici; dai metodi di esame su strisci alle tecniche speciali quali decalcificazione, depigmentazione, microincinerazione; dai metodi speciale di esame (microscopia polarizzante e di fluorescenza, micromanipolazione, autoradiografia, ultricentrifugazione di cellule intere, microelettroforesi di cellule o microbi in sospensione) alle tecniche di preparazione per il microscopio elettronico. Due capitoli sono anche dedicati uno alle tecniche di numerazioni microscopiche e l'altro alle tecniche di prelevamenti per esami microscopici. Il volume si conclude con una tavola degli indici di rifrazione, un assai utile vocabolario tecnico franco-anglo-tedesco ed un dettagliato indice analitico.

L'opera rappresenta insomma un ottimo compendio di ogni aspetto essenziale della moderna microscopia, e la sua lettura costituirà pertanto per lo studioso non solo un utile aggiornamento della materia, ma spesso anche una sorgente di idee di lavoro; essa si aggiunge con pieno diritto alla lunga serie degli ottimi Traités e Précis pubblicati dalla benemerita Masson & C.ie. Lodevole la veste editoriale, e molto buona l'iconografia.

M. Ricci

Sprehn C. E. W. - *Elminthen und Helminthiases des Schweines.* VI + 174 pp., 114 figg. G. Fischer Verlag, Jena 1957. 12,30 D.M.

Quest'opera — Heft 7 dei *Parasitologische Schriftenreihe* pubblicati da W. Eichler, C. E. W. Sprehen e H. J. Stammer — rappresenta una vera piccola enciclopedia di tutto quanto si riferisce agli elminti ed alle elmintiasi dei suini. La profonda competenza dell'A. ha consentito infatti che la materia fosse scelta nel modo più oculato: nessun aspetto essenziale è stato trascurato, e ciascuno ha avuto trattazione commisurata alla sua effettiva importanza. Fatti questi che uniti alla ricchezza dell'informazione ed alla chiarezza dell'esposizione fanno facilmente prevedere un ottimo successo dell'opera sia nel vasto pubblico dei veterinari che in quello più particolare dei cultori dell'elmintologia.

L'opera è divisa in una Parte generale ed una Parte speciale. Nella prima viene sommariamente ricordata la ripartizione sistematica delle specie di elminti del suino, sono elencate le specie che il suino può trasmettere all'uomo o che ha in comune con questi, e riportate le 25 specie presenti in Germania; altri capitoli trattano della importanza patogena degli elminti del suino, della diagnosi delle relative malattie e degli indirizzi generali della lotta contro di esse. La seconda parte si apre con la descrizione in ordine sistematico di tutte le specie di elminti dei suini: l'esposizione dei dati morfologici e biologici è quasi sempre corredata da ottime figure, in parte originali; ed è preceduta dalle diagnosi di tutti gli aggruppamenti sistematici superiori. Un secondo capitolo è dedicato alle elmintiasi; quelle da elminti adulti sono ripartite a seconda dell'organo colpito, p. es. dello stomaco, dell'intestino ecc., per ciascuna considerandosi etiogenesi e patologia, sintomatologia, anatomia patologica, diagnosi e lotta (terapia e profilassi); quelle da larve sono invece trattate per gruppi sistematici. Brevissimi, ma di grande utilità pratica, sono gli ultimi due capitoli: il terzo non comprende infatti che una chiave dicotomica per la determinazione degli elminti dei suini; ed il quarto è solo l'elenco dei generi e delle specie di elminti del suino con i loro sinonimi. Una ricca bibliografia di 528 citazioni conclude l'opera; aggiungeremo in materia che, molto lodevolmente, richiami alla letteratura si trovano al termine di ogni argomento anche se brevemente trattato.

M. Ricci

« *Industry and Tropical Health - III* ». - *Proceedings of the Third Conference, Industrial Council for Tropical Health, Sponsored by the Harvard School of Public Health, April* 16-18, 1957, *in Boston*. 261 pp.. Published for the Industrial Council for Trop. Health by the Harvard School of Public Health, Boston, 1957.

In una precedente recensione (Riv. Parass. *17* (1): 64, 1956) ci occupammo della II Conferenza per l'industria ed i problemi sanitari dei tropici. Nel 1957, a tre anni di distanza, è stata tenuta a Boston, presso l'Università di Harvard, la III Conferenza, dei cui Atti diamo qui notizia. Durante la prima giornata di lavori, dopo le relazioni introduttive, è stato ampiamente trattato l'argomento della malaria. Le conferenze tenute la sera della prima giornata hanno avuto per titoli: « Il ruolo del governo nella ricerca in medicina tropicale » e « La responsabilità dell'industria nella sovvenzione della ricerca in medicina tropicale ». Durante la seconda giornata sono stati svolti i seguenti argomenti: Immunizzazione; poliomielite; enteriti; problemi di organizzazione dei servizi igienici nei tropici; nutrizione nei tropici; istruzione in igiene; epatiti infettive; argomenti di ordine sociale ed organizzativo nei tropici; malattie del torace.

Come già rilevato nella nostra recensione sul 2° volume, anche questo 3° volume è una buona rassegna, nel campo profilattico e terapeutico, dei moderni concetti di medicina tropicale. Alcuni argomenti hanno trovato anche in questa riunione come già nella seconda, ampia trattazione (malaria, poliomielite, tubercolosi, ecc.); altri vengono considerati per la prima volta in questa serie di conferenze (epatiti infettive, ecc.). Si tratta di una messa a punto, ovvero di un aggiornamento, dei singoli problemi e le notizie che vi si attingono rappresentano il risultato dell'esperienza acquisita dalle industrie e dalle forze armate americane nei tropici durante questi ultimi anni. Non può non essere di utilità, quindi, la lettura di tale opera per l'igienista e per il medico tropicalista. Aggiungiamo che la materia è trattata da ben noti specialisti e che la lettura, specie di alcune pagine del volume, è avvincente. Ogni argomento viene seguito da un'ampia discussione. Chiudono l'opera una lista dei tecnici intervenuti, accompagnata da note biografiche, ed un indice analitico.

Segnaliamo questo 3° volume non solo agli igienisti e tropicalisti italiani, ma anche a coloro, appartenenti a sfere apparentemente estranee alle scienze mediche, ai quali la lettura del tema: « La responsabilità dell'industria nella sovvenzione della ricerca in medicina tropicale » potrebbe aprire vasti orizzonti ancora inesplorati.

S. BETTINI

Direttore responsabile: Dott. E. MOSNA

Soc. An. Poligrafica Italiana Roma, Via della Guardiola, 22

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 4. - ottobre 1958

ATTIVITA' AMEBICIDA DI VARIE SOSTANZE (ANTIBIOTICI E COLORANTI) VERSO ALCUNI STIPITI DI *E. HISTOLYTICA*, COLTIVATI IN TERRENO MONO E DIFASICO

L. MAGAUDDA - BORZI' e L. PENNISI (*)

In una nota precedente (1957) avevamo riferito sui risultati ottenuti da una serie di ricerche intese a determinare l'attività di alcune sostanze (antibiotici e coloranti) sulla flora batterica associata ad uno stipite di *E. histolytica* della nostra collezione (ceppo Napoli), coltivato in terreno di Boeck e Drbohlav.

Nel corso di dette ricerche, che rientrano in un piano di lavoro inteso ad ottenere colture di *E. histolytica* prive, in modo più o meno completo, di batteri, avemmo modo di controllare contemporaneamente l'attività amebicida delle stesse sostanze verso il ceppo di *E. histolytica* adoperato.

Confrontando i risultati ottenuti con quelli di altri ricercatori, che si erano occupati dell'argomento, notammo una differenza, a volte notevole, nella attività amebicida delle sostanze sperimentate.

Tale differenza poteva essere, in parte, imputata al tipo di terreno, difasico o monofasico usato nelle prove: alcuni AA. (DOBELL, BRADNER-RAWSON, BRADIN, HANSEN) hanno, infatti, adoperato terreni monofasici, mentre altri (LYNCH, SENECA, ecc.) terreni difasici, benchè questi ultimi siano ritenuti, in genere, meno adatti ad una esatta valutazione dell'attività amebicida in « vitro ».

La differenza nei risultati ottenuti dai vari AA. poteva, però, essere attribuita anche alla maggiore o minore sensibilità del ceppo di ameba usato, giacchè è noto, anche se non ampiamente confermato, come gli stipiti di *E. histolytica* possano presentare una grande variabilità in questo senso.

La presente nota ha, appunto, lo scopo di chiarire questi due punti: l'influenza esercitata dal terreno colturale e la influenza esplicata dal ceppo di *E. histolytica* adoperato sull'attività amebicida « in vitro » di varie sostanze (antibiotici e coloranti).

(*) *Istituto di Igiene dell'Università di Messina* (Direttore: prof. R. DE BLASI).

MATERIALE E TECNICA

a) ceppi di *E. histolytica*: sono stati adoperati quattro ceppi di *E. histolytica*, coltivati nel nostro Istituto e cioè:

— ceppo «*Napoli*», in associazione con *E. coli, Ps. aeruginosa* ed un bacillo anaerobio, gram negativo;

— ceppo «*Amburgo*», in associazione con la stessa flora del «*Napoli*»;

— ceppo «*EdM*», in associazione con *E. coli* e *Ps. aeruginosa;*

— ceppo «*Lero*», in associazione con *E. coli* ed un bacillo anaerobio.

b) *terreni colturali*: abbiamo usato un terreno difasico ed uno monofasico e precisamente:

1) terreno difasico: Boeck e Drbohlav (BD), preparato secondo BUONOMINI e coll.;

2) terreno monofasico: Locke-siero (LS), preparato secondo una nostra formula:

liquido di Locke modificato	parti	7
siero di cavallo inattivato	»	1

I terreni sono stati distribuiti nei tubi nelle seguenti quantità note:

— cc. 4 di fase solida e cc. 4 di fase liquida per il terreno di Boeck-Drbohlav;

— cc. 6 per il terreno Locke-siero.

Dopo il consueto controllo di sterilità, si aggiungevano nei tubi, al momento dell'uso, tracce d'amido di riso deproteinizzato.

c) *sostanze saggiate*: diamo l'elenco delle sostanze (antibiotici e coloranti) di cui è stata provata l'attività amebicida «in vitro»:

Sostanze saggiate	*Soluzione madre*
1) acromicina (Tetraciclina cloridrato Lederle)	2.500 γ /cc.
2) bacitracina (Farmitalia)	40.000 γ /cc.
3) cicloserina (Farmitalia)	2.500 γ /cc.
4) cloramfenicolo (Cloromicetina Parke Davis)	2.500 γ /cc.
5) colimicina (Smit)	250.000U/cc.
6) oleandomicina (Pfizer)	2.500 γ /cc.
7) polimixina B (Farmitalia)	2.500 γ /cc.
8) spiramicina (Farmitalia)	2.500 γ /cc.
9) terramicina (*) (Ossitetraciclina tampon. Pfizer)	1.000 γ /cc.

(*) La Pfizer ci ha gentilmente fornito una terramicina, di sua produzione, tamponata a pH 7,2 e la cui soluzione si mantiene a 37°C. per 48 ore circa.

10) acriflavina (Triplaflavina neutra Cassella) 1%
11) metilvioletto (Grübler) 1%
12) violetto di genziana (Grübler) 1%
13) verde brillante (Bayer) 5%
14) verde malachite (Bayer) 5%

La oleandomicina e la spiramicina non erano state ancora saggiate in prove di amebicidia « in vitro ».

Di ciascuna sostanza è stata allestita una soluzione madre in liquido di Locke (vedi elenco) da aggiungere al terreno nella quantità adatta ad ottenere le concentrazioni finali volute.

Per le sostanze stabili la soluzione madre venne preparata « *una tantum* » ed usata per tutte le prove; per le sostanze labili era, invece, preparata, di volta in volta, al momento dell'uso.

Venivano, quindi, immesse nei tubi le sostanze in esame, nella quantità atta ad ottenere le concentrazioni finali volute, e si procedeva, subito dopo, all'insemenzamento con una sospensione di trofozoiti (cc. 0,5 per ogni tubo), ben omogeneizzata mediante pipettamento e titolata a 200.000 elementi per 1 cc.

Le prove erano condotte sempre in doppio (due tubi per la stessa concentrazione di una sostanza) e sempre in parallelo a tubi controllo, privi cioè delle sostanze in esame. I dati riferiti per ogni sostanza rappresentano la media dei risultati ottenuti.

Dopo incubazione per 48 ore a 37°C. si procedeva alla lettura delle prove, allestendo numerosi vetrini per ogni tubo ed osservandoli al microscopio, in camera di Foot. Nei casi negativi (assenza completa di trofozoiti vitali) si eseguiva una subcoltura, che veniva controllata dopo altre 48 ore d'incubazione a 37°C. Una data concentrazione della sostanza in esame veniva considerata amebicida, allorquando anche questo controllo risultava negativo.

Risultati

I risultati, riportati nella tabella 1, mostrano l'attività amebicida delle 14 sostanze saggiate verso quattro stipiti di *E. histolytica* (Napoli, Amburgo, EdM, Lero) coltivati in terreno monofasico (L.S.) e difasico (B.D.).

TABELLA 1

Attività amebicida delle sostanze saggiate verso quattro stipiti di E. histolytica *(Napoli, Amburgo, EDM, Lero) coltivati in terreno monofasico (r.s.) e difasico (B.D.).*

Sostanza saggiata	Terreno usato	Stipiti usati			
		Napoli	Amburgo	EDM	Lero
Acromicina	LS BD	19 (*) 227	27 470	27 336	127 770
Bacitracina	LS BD	1190 + 7800	2300 + 7800	2300 + 7800	3380 + 7800
Cicloserina	LS BD	273 + 2500	443 + 2500	333 + 2500	655 + 2500
Cloramfenicolo	LS BD	379 + 2500	565 + 2500	470 + 2500	610 + 2500
Colimicina	LS BD	2662 (**) 18520	1910 30000	2662 37800	7460 37800
Oleandomicina	LS BD	468 + 2500	789 + 2500	789 + 2500	825 + 2500
Polimixina B.	LS BD	212 909	240 1500	277 1500	333 1538
Spiramicina	LS BD	806 + 2500	937 + 2500	1176 + 2500	1390 + 2500
Terramicina	LS BD	10 100	17 280	19 181	38 307
Acriflavina	LS BD	30 755	60 1000	152 1500	60 1000
Metilvioletto	LS BD	30 1071	152 1500	152 1500	152 1500
Verde brillante	LS BD	225 6900	757 8333	757 7547	757 7547
Verde malachite	LS BD	757 5375	2898 12923	1490 7547	1490 7547
Violetto genziana	LS BD	225 1803	714 2857	714 2913	580 2370

(*) Le cifre indicano la concentrazione amebicida delle sostanze saggiate, espresse in gamma.

(**) La concentrazione amebicida, per la colimicina, è espressa in Unità.

Per alcune sostanze, addizionate al terreno difasico, non fu possibile precisare la dose amebicida: non si potè, infatti, sperimentare con una quantità maggiore essendo le soluzioni madri già quasi sature.

In questi casi abbiamo premesso un segno + alla cifra che indica la concentrazione massima raggiunta dalla sostanza in esame.

Appare, anzitutto, evidente come le 14 sostanze saggiate mostrino attività amebicida diversa; tra gli antibiotici; la *terramicina* e l'*acromicina,* tra i coloranti: l'*acriflavina* e il *metilvioletto* presentano un'attività di gran lunga superiore alle altre sostanze.

I due nuovi antibiotici saggiati: l'*oleandomicina* e la *spiramicina* presentano, invece, attività amebicida molto modesta.

Una osservazione anche superficiale dei risultati ottenuti mette, però, in evidenza come la maggiore o minore attività amebicida esplicata dalle sostanze in esame sia strettamente legata al tipo di terreno e al ceppo di *E. histolytica* usati.

Per quanto riguarda l'influenza del terreno ci sembra utile riportare nella tabella 2 il rapporto esistente tra concentrazione amebicida delle sostanze in esame nel terreno difasico e in quello monofasico, dando a quest'ultima il valore eguale a 1.

E' possibile, in tal modo, avere una idea esatta delle notevoli differenze tra concentrazioni amebicide nel terreno difasico e quelle nel monofasico: per il violetto di genziana occorre, ad esempio, una dose quattro volte superiore nel difasico rispetto al monofasico (attività amebicida per il ceppo Amburgo) e per il metilvioletto una dose, addirittura, 35 volte superiore (attività amebicida per il ceppo Napoli).

Questi due esempi limite, come, del resto, tutti i dati riportati nella tabella 2, stanno chiaramente a dimostrare la importanza della costituzione del terreno nella esecuzione delle prove di amebicidia. Viene, così, a essere confermata, sulla base di prove sperimentali, l'ipotesi di quegli AA. che considerano i terreni difasici poco adatti a tal genere di ricerche.

A questo proposito è opportuno sottolineare la necessità di usare terreni monofasici di composizione molto semplice. Sarebbe, infatti, errato rendere più complessa la formula del monofasico, aggiungendo, come alcuni AA. fanno, proteine, estratto di organi, vitamine, ecc., giacchè si verrebbero, in tal modo, a ripetere gli stessi inconvenienti lamentati per il terreno difasico.

Il terreno monofasico, da noi allestito ed usato nelle prove, risponde bene a questo concetto, in quanto i componenti sono ridotti al minimo essenziale compatibile con un buon sviluppo dei trofozoiti.

Se, da un lato, il terreno ha una notevole influenza nelle prove di amebicidia « in vitro », non minore importanza ha lo stipite di *E. histolytica* usato.

Già, dall'osservazione dei dati riportati nelle tabelle 1 e 2, risulta evidente come la concentrazione amebicida delle sostanze saggiate presenti variazioni

TABELLA 2

Rapporto tra concentrazioni amebicide delle sostanze in esame nel terreno difasico e in quello monofasico (concentrazione amebicida nel terreno monofasico considerata eguale ad 1).

Sostanza saggiata	Stipiti usati			
	Napoli	Amburgo	EDM	Lero
Acromicina	12,00	17,40	12,44	6,06
Bacitracina	+ 6,55 (*)	+ 3,39	+ 3,39	+ 2,30
Cicloserina	+ 9,15	+ 5,64	+ 7,50	+ 3,84
Cloramfenicolo	+ 6,59	+ 4,42	+ 5,31	+ 4,09
Colimicina	6,94	15,70	13,44	5,06
Oleandomicina	+ 5,34	+ 3,16	+ 3,16	+ 3,03
Polimixina B	4,28	6,25	5,41	4,61
Spiramicina	+ 3,10	+ 2,66	+ 2,12	+ 1,79
Terramicina	10,00	16,40	9,54	8,70
Acriflavina	25,16	16,66	9,86	16,66
Metilvioletto	35,70	9,86	9,86	9,86
Verde brillante	30,66	11,00	9,96	9,96
Verde malachite	7,10	4,46	5,06	5,06
Violetto genziana	8,01	4,00	4,07	4,08

(*) Il segno + si riferisce alle sostanze per le quali non è stato possibile stabilire la dose amebicida nel terreno difasico. In tal caso il rapporto rispetto al terreno monofasico è, logicamente, superiore alla cifra segnata.

più o meno notevoli, a prescindere dal terreno, in rapporto allo stipite di *E. histolytica* usato.

Per maggiore chiarezza crediamo, tuttavia, utile riportare in due tabelle separate (vedi tabelle 3 e 4) il comportamento dei quattro stipiti verso le sostanze in esame sia sul terreno monofasico che in quello difasico.

In dette tabelle abbiamo considerato il ceppo più sensibile (Napoli) eguale a 1, rapportando ad esso la sensibilità degli altri tre stipiti verso le sostanze saggiate.

TABELLA 3

Sensibilità degli stipidi di E. histolytica *(Napoli, Amburgo, EDM, Lero) coltivati in terreno monofasico, verso le sostanze in esame (sensibilità rapportata al ceppo più sensibile, considerata eguale ad* 1).

Sostanze saggiate	Stipiti usati			
	Napoli	Amburgo	EDM	Lero
Acromicina	1,00	1,42	1,42	6,68
Bacitracina	1,00	1,93	1,93	2,84
Cicloserina	1,00	1,62	1,22	2,40
Cloramfenicolo	1,00	1,50	1,24	1,60
Colimicina	1,38	1,00	1,38	3,90
Oleandomicina	1,00	1,68	1,68	1,76
Polimixina B	1,00	1,13	1,30	1,57
Spiramicina	1,00	1,15	1,45	1,72
Terramicina	1,00	1,70	1,90	3,80
Acriflavina	1,00	2,00	5,06	2,00
Metilvioletto	1,00	5,06	5,06	2,00
Verde brillante	1,00	3,36	3,36	3,36
Verde malachite	1,00	3,82	1,96	1,96
Violetto genziana	1,00	3,17	3,17	2,57
Risultati medi con:				
antibiotici	1,04	1,46	1,50	2,92
coloranti	1,00	3,48	3,72	2,36
Risultati medi totali . . .	1,02	2,18	2,30	2,72

Dall'osservazione dei dati riportati nelle tabelle 3 e 4 appare evidente come, sia nel terreno monofasico che in quello difasico, pur con le note differenze nella concentrazione amebicida legate al terreno, il ceppo Lero si mostri molto più resistente degli altri antibiotici saggiati; vengono poi, in ordine decrescente: l'Amburgo, l'EdM e il Napoli. Per quanto riguarda le sostanze coloranti presenta, invece, maggiore resistenza il ceppo Amburgo, seguito dall'EdM, Lero e Napoli.

TABELLA 4

Sensibilità degli stipiti di E. histolytica *(Napoli, Amburgo, EDM, Lero) coltivati in terreno difasico, verso le sostanze in esame, (sensibilità rapportata al ceppo più sensibile « Napoli », considerata eguale ad 1).*

Sostanza saggiata	Stipiti usati			
	Napoli	Amburgo	EDM	Lero
Acromicina	1,00	2,07	1,48	3,39
Colimicina	1,00	1,62	2,04	2,04
Polimixina B	1,00	1,65	1,65	1,69
Terramicina	1,00	2,80	1,81	3,07
Acriflavina	1,00	1,32	1,98	1,32
Metilvioletto	1,00	1,40	1,40	1,40
Verde brillante	1,00	1,20	1,09	1,09
Verde malachite	1,00	2,40	1,40	1,40
Violetto genziana	1,00	1,58	1,61	1,31
Risultati medi con:				
antibiotici	1,00	2,04	1,74	2,55
coloranti	1,00	1,58	1,50	1,30
Risultati medi totali	1,00	1,78	1,60	1,85

Facendo la media dei risultati ottenuti sia con gli antibiotici che con i coloranti (vedi tabelle 3 e 4) possiamo, tuttavia, dire che il ceppo Lero e Amburgo presentano presso a poco il medesimo grado di resistenza alle sostanze saggiate, mentre il ceppo Napoli si dimostra il più sensibile.

Tali differenze da stipite a stipite sono, a nostro avviso, da imputare a caratteristiche biologiche proprie del ceppo e non a fattori concomitanti ambientali. Sia il ceppo Amburgo (uno tra i più resistenti) che il Napoli (il più sensibile) crescono infatti, in associazione alla medesima flora batterica costituita, come si è detto, da *Ps. aeruginosa, E. coli* e un bacillo anaerobio.

Dopo aver dimostrato come la maggiore o minore attività amebicida esplicata dalle sostanze in esame sia strettamente legata al tipo di terreno e al ceppo di *E. histolytica* usati, ci sembra utile riassumere nella tabella 5 i dati relativi alla attività delle sostanze saggiate, espressa in percentuale con base 1 corrispondente alla sostanza più attiva.

TABELLA 5

Attività amebicida delle sostanze in esame verso quattro stipiti di E. histolytica (*Napoli, Amburgo, EDM, Lero) sia in terreno monofasico che difasico, (concentrazione della sostanza più attiva uguale ad* 1).

Sostanza saggiata	Terreno LS o BD	Ceppi usati				
		Napoli	Amburgo	EDM	Lero	Sensibilità media
Terramicina . .	LS	1	1	1	1	1
	BD	10	16	62	34	—
Acromicina . .	LS	2	2	2	3	2,25
	BD	23	28	18	20	—
Acriflavina . .	LS	3	4	8	2	4,25
	BD	75	59	79	26	—
Metilvioletto . .	LS	3	9	8	4	6
	BD	107	88	79	39	—
Polimixina B .	LS	21	14	15	9	14,75
	BD	91	88	79	41	—
Cicloserina . .	LS	27	26	18	17	22
	BD	+ 250	+ 147	+ 131	+ 66	—
Cloramfenicolo .	LS	38	33	25	16	28
	BD	+ 250	+ 147	+ 131	+ 66	—
Violetto genziana	LS	23	42	38	15	30
	BD	180	168	153	62	—
Verde brillante .	LS	23	44	40	20	32,25
	BD	690	490	397	198	—
Oleandomicina .	LS	47	46	42	22	39,25
	BD	+ 250	+ 147	+ 131	+ 66	—
Spiramicina . .	LS	81	55	62	36	58,50
	BD	+ 250	+ 147	+ 131	+ 66	—
Verde malachite	LS	76	170	78	39	90,75
	BD	537	760	397	138	—
Bacitracina . .	LS	119	135	121	89	116
	BD	+ 780	+ 459	+ 410	+ 205	—

Dai dati riportati nella tabella 5 risulta evidente come la terramicina e l'acromicina siano, tra gli antibiotici, le sostanze dotate di maggiore attività amebicida « in vitro », seguite, tra i coloranti, dall'acriflavina e dal metilvioletto.

Pur con le differenze notevoli legate al terreno ed al ceppo di *E. histolytica* usati, appare, infatti, chiaro come i quattro stipiti in esame mostrino tutti una maggiore sensibilità verso le suddette sostanze.

Questa concordanza di comportamento non si manifesta con le sostanze meno attive; influiranno, in tal caso, con ogni probabilità, le notevoli concentrazioni raggiunte nelle prove.

Considerazioni e conclusioni

E' stata saggiata l'attività amebicida «in vitro» di 14 sostanze (9 antibiotici e 5 coloranti) su quattro stipiti di *E. histolytica*, coltivati in terreno monofasico (Locke-siero) e difasico (Boeck-Drbohlav).

Dai risultati ottenuti si possono trarre le seguenti considerazioni:

1) l'attività amebicida delle sostanze saggiate è in rapporto al tipo di terreno colturale usato. Nelle prove eseguite in terreno difasico (BD) sono state necessarie, infatti, dosi notevolmente maggiori (da 4 a 35 volte) di quelle attive nel terreno monofasico (LS);

2) l'attività amebicida delle sostanze saggiate è in rapporto agli stipiti di *E. histolytica* usati. I quattro ceppi in esame (Napoli, Amburgo, EdM, Lero) mostrano infatti una diversa sensibilità verso le sostanze saggiate, legata, con ogni probabilità, a proprietà biologiche individuali, non facilmente dimostrabili. Conforta questa ipotesi il fatto che i due ceppi: Napoli e Amburgo, l'uno il più sensibile e l'altro tra i più resistenti, crescono associati ad una identica flora batterica;

3) le differenze nell'attività amebicida, in rapporto al terreno e al ceppo di *E. histolytica* usati, sono, in linea di massima, di ordine quantitativo, nel senso che le sostanze più attive esplicano la loro attività su tutti gli stipiti di ameba a concentrazioni, però, diverse;

4) tenuto conto delle differenze legate al terreno e al ceppo di *E. histolytica usati*, hanno mostrato attività amebicida più spiccata, verso tutti i quattro stipiti in esame: la terramicina e l'acromicina, tra gli antibiotici; l'acriflavina e il metilvioletto, tra i coloranti.

I due antibiotici: oleandomicina e spiramicina, saggiati, per la prima volta, nella loro attività amebicida « in vitro » hanno mostrato una efficacia piuttosto modesta.

Sulla base dei risultati da noi ottenuti, non sempre sovrapponibili a quelli degli altri AA. che si sono occupati nell'argomento, ci sembra possibile affermare come le prove di amebicidia «in vitro» abbiano un valore relativo, essendo riferibili solo ad un determinato stipite di *E. histolytica* e ad un particolare terreno colturale.

E', pertanto, facilmente spiegabile la differenza, alle volte, notevole, nei risultati ottenuti per una stessa sostanza dai diversi AA., giacchè è, a tutt'oggi, impossibile avere dati comparabili tra loro.

RIASSUNTO

Gli AA. saggiano l'attività amebicida « in vitro » di 14 sostanze (9 antibiotici e coloranti) verso quattro stipiti di *E. histolytica* (Napoli, Amburgo, EDM; Lero), coltivati in terreno monofasico (Locke - siero) e difasico (Boeck e Drbohlav).

Dimostrano come l'attività amebicida, notevole per alcune sostanze in esame (terramicina, acromicina, acriflavina, metilvioletto), sia in rapporto al terreno colturale e al ceppo di *E. histolytica* usati.

SUMMARY

The in vitro amebicidal activity of forty substances (nine antibiotic and five colours) on four strains of *E. histolytica* (Napolf, Amburgo, EdM, Lero), cultured in monophasic (Locke - serum) and diphasic (Boeck and Drbohlav) media has been tested by the Auctors. The amebicidal activity, which is high for some of the tested substances (terramycine, achromycine, achriflavine, methilviolet) depend from the cultural medium and the strain of a histolytica.

BIBLIOGRAFIA

1) Bradin J. L., Hansen E. L. (1950): Indirect in vitro action of antibiotic in comparison with activity of accepted amebicides. *Amer. J. Trop. Med.*, *30*, 27.

2) Bradner W. T., Rawson G. W. (1951): An « in vitro » method of screening amebicidal agents using the Phillips culture. *Science*, *113*, 674.

3) Dobell C. (1947): An improved method for testing the action of emetine and other chemicals on *Entamoeba histolytica* in cultures. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, *30*, 301.

4) Hansen E. L., Bennett B. M. (1952): Effects of toxic agents on *Endamoeba histolytica*. *Exper Parasit.*, *1*, 143.

5) Lynch J. E., Bamforth B. J., Goeckeritz D. (1956): The laboratory evaluation of antiamebic activity. The comparative results obtained by the use of in vitro and in vivo methods. *Antibiotics & Chemoterapy*, *6*, 330.

6) Magaudda - Borzì L., Pennisi L. (1956): Attività in vitro di alcune sostanze (antibiotici e coloranti) sulla flora batterica associata ad uno stipite di *E. histolytica* (ceppo Napoli). *Atti Soc. Pel. Sc. Fis. Mat. Nat. 3*, 455.

7) Seneca H., Bergendahl E. (1954): Carbomycin, a growth maintaining factor for *Endamoeba histolytica* cultures. *Science*, *120*, 988.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 4 - Ottobre 1958

CONTRIBUTO ALLA CONOSCENZA DEI PREDATORI DELLE OVA DI *LATRODECTUS TREDECIMGUTTATUS* ROSSI

L. RIVOSECCHI e S. BETTINI (*)

Nel corso di ricerche su *L. tredecimguttatus* abbiamo avuto l'opportunità di esaminare sacchi ovigeri di questo ragno provenienti da varie località della provincia di Latina (Lazio), da Orbetello (Toscana) e da Pola (Istria, Jugoslavia) constatando che le ova erano attaccate da larve di Icneumonidi a loro volta parassitate da larve di Calcididi (Fig. 1).

Gli adulti provenienti da tali larve furono poi inviati al Dr. MASI e al Dr. FERRIÈRE che vi identificarono: *Pimpla oculatoria* Grav. (*Hym. Ichneumonidae*) e *Pedobius* sp. (*Hym. Chalcididae*) nel materiale proveniente dal Lazio e Toscana e *Gelis niger* Bris. (*Hym. Ichneumonidae*) nel materiale proveniente dall'Istria.

Successivamente sono stati esaminati sacchi ovigeri di *L. tredecimguttatus* provenienti da Santa Marinella (Lazio) e da Orbetello raccolti in media 1 volta al mese (vedi Tab. 2) per tutto il 1957. Tali sacchi ovigeri hanno fornito 2 specie di Imenotteri e 1 Coleottero, cioè: *Pimpla oculatoria* Grav., *Pedobius* sp. e *Malachius* sp. (*Coleoptera Malachidae*).

Latrodectus tredecimguttatus è l'unica specie di ragno della fauna italiana il cui morso sia veramente pericoloso per l'uomo (BETTINI 1957). Com'è noto dalla letteratura, nel passato si sono verificati improvvisi e notevoli aumenti del numero di casi di latrodectismo da *L. tredecimguttatus*, sia in Italia (BETTINI 1954) che in Jugoslavia (MARETIC, comunicaz. personale), negli anni 1947-1949, in Corsica nel 1833, in Spagna nel 1830-34 ed in Russia nel 1838-39 (confr. VELLARD J.).

Se si esclude la possibilità affacciata da alcuni AA che l'aumento dei casi sia da attribuirsi principalmente alla capacità dei medici di fare meglio la diagnosi (HERMES et al.) dobbiamo convenire che tali periodici aumenti dipen-

(*) *Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Parassitologia.*

dono da una aumentata frequenza degli incontri uomo - ragno (Bettini 1954) che a sua volta è regolata da una serie di fattori determinanti: primi fra questi sono la densità della popolazione umana e la densità della popolazione del ragno. Prendendo in considerazione la seconda, è evidente che la densità della popolazione di *L. tredecimguttatus* può essere influenzata dal tipo di coltura



Fig. 1. — Sezione di sacco ovigero di *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi, contenente 5 larve di *Pimpla oculatoria* Grav. di cui una sola (in basso a sinistra) non parassitata. Delle 4 parassitate, una (in alto al centro) contiene 14 larve di *Pedobius*. Nelle tre rimanenti le larve di *Pedobius* sono invece fuoriuscite e in due dei bozzoli si sono trasformate in ninfe. Le ova di *L. tredecimguttatus* comprese nella zona punteggiata sono quelle non consumate dalle larve di *P. oculatoria*, mentre quelle comprese nelle zone chiare (bozzoli di *P. oculatoria*) sono solo gusci vuoti. Le frecce indicano i fori di uscita dei *Pedobius* sfarfallati.

agricola prevalente in una data zona, dalle variazioni climatiche ed anche dai nemici naturali del ragno (1) e delle sue ova (2).

E' appunto questo ultimo fattore che abbiamo preso in considerazione in questo lavoro, nel quale, oltre a fornire una breve illustrazione degli Insetti trovati dentro le ooteche, vengono riportate le percentuali dei sacchi ovigeri predati in ciascuna delle raccolte effettuate (Tab. 1 e 2).

Pimpla oculatoria Grav.

Questa specie insieme ad altre dello stesso genere è ben nota come predatrice allo stato di larva di ova di Aracnidi. (Confronta G. GRANDI). Tra questi viene menzionato nel catalogo di DELLA TORRE anche *L. tredecimguttatus* dai cui sacchi ovigeri fu ottenuta la *Pimpla angens* Grav (= *P. ovivora* Boh.), una specie questa di cui è stata studiata dal VOUKASSOVITCH la biologia dell'adulto e della larva come predatrice di ova di ragni del genere *Epeira*. Secondo questo A. la larva di *P. ovivora* pur essendo molto simile a quella di *P. oculatoria* se ne distinguerebbe per il minore numero di spine situate sulle prominenze dorsali (*). Le larve da noi raccolte nei sacchi ovigeri *L. tredecimguttatus* a S. Marinella (Lazio) non differivano sostanzialmente dalle larve di *Pimpla* descritte da VOUKASSOVITCH come *P. ovivora*, presentavano da 60 a 90 spine nelle protuberanze dei segmenti 6°, 7° e 8°; da 25 a 60 in quelle dei segmenti 3°, 4°, 5°, ed anche la forma e le dimensioni oltre il numero era estremamente variabile. Le spine possono essere infatti larghe e tozze, sottili e allungate e talvolta anche sdoppiate alla estremità (vedi fig. 2).

La larva matura di *Pimpla oculatoria* è lunga 8 mm e larga 2,5, ha una forma piuttosto slanciata e una segmentazione molto marcata con 8 protube-

---

(1) Come nemici di *Latrodectus mactans* (adulto) THORPE R. e WOODSON W., e BOGEN M. e RUSSEL N. suppongono che abbiano importanza in California alcune specie di Rettili (*Bufo marinus* e *Gerrhonotus multicarinatus* W.), Aracnidi e Insetti tra cui un Imenottero: *Chalybion cyaneum* che approvigiona i suoi nidi con i *Latrodectus* previamente paralizzati (confronta IRWING W. G. e HINNMAN E. H.).

(2) Vari AA. hanno segnalato Insetti che si sviluppano a spese delle ova di *Latrodectus*. Particolarmente ben conosciuti sono i nemici delle ova di *L. mactans* in America. Questi sono: un Icneumonide del genere *Gelis* (HERMES et al.), un Dittero Acalittero della famiglia dei *Chloropidae*: *Pseudogaurax signatus* Lw. (PIERCE), due specie del genere *Baeus* (*Proctotrupidae-Scelioninae*): *B. latrodecti* Doz. (DOZIER, HERMES et al.) e *B. californicus* Pie. (PIERCE). Le larve dei Cloropidi del genere *Pseudogaurax* sono predatrici in tutta l'America Centrale e Settentrionale di ova di molte specie di ragni (HALL) mentre quelle di *B. californicus* attaccano solo *L. mactans*.

Per tale motivo PEMBERTON, PEMBERTON e ROSA ne hanno realizzato un allevamento in massa in laboratorio, tentando il suo impiego nelle isole Hawai per una lotta biologica contro i *Latrodectus*. Tale lotta, secondo quanto riferisce BIANCHI avrebbe avuto un certo successo contro *L. mactans* ma non contro le altre specie di ragni che infestano le isole.

ranze dorsali nei segmenti 3-9, ogni protuberanza è formata da due labbra, ciascuna delle quali presenta spinule dirette rispettivamente in senso craniale e caudale. Le aperture spiracolari sono 9 e mancano nei segmenti 2° e 3° del torace. Il capo visto di fronte (Fig. 2) è largo 0,7 mm, lungo 0,5 e presenta 4 macchie brune lungo il margine dorsale di cui 2 più piccole centrali e 2 più grandi laterali, all'estremità delle quali si hanno le antenne. Strie di colore bruno-chiaro delimitano il labium dalle mascelle e si continuano intorno ai

TABELLA 1

Sacchi ovigeri di Latrodectus tredecimguttatus *raccolti in provincia di Latina (Lazio) e ad Orbetello (Toscana) tra il* 24-10-54 *e il* 20-30-55

Località e data	N.	Contenenti larve e pupe di *Pimpla oculatoria*		Contenenti larve di *P. oculatoria* parassitate da *Pedobius*	
		N. (1)	°/₀ rispetto a N.	N. (2)	°/₀ rispetto a N. (1)
Latina (Sezze e Priverno) 24/10/54	390	9	2	6	66
» (Sezze e Priverno) 28-30/10/54	68	2	3	1	50
» Priverno 3/11/54	62	2	3	1	50
» Sezze 26/11/54	36	1	2	—	—
» Priverno 26/12/54	9	—	—	—	—
» P. (Cernaia) 7-8/1/55	60	1	1	1	100
» S. (Le Grotte) 25/1/55	20	—	—	—	—
» Sezze (Fosso) 30/3/55	21	—	—	—	—
» Sonnino 24/3/55	25	—	—	—	—
» Sonnino 25/3/55	14	—	—	—	—
» Roccagorga 14/3/55	27	—	—	—	—
	732	15	2	9	60
Orbetello 30/ 9/54	307	10	3,2	7	70
» 16/11/54	168	7	4,1	4	57
» 20/ 1/55	76	1	1,3	1	100
» 20/ 3/55	32	6	18,8	3	50
	583	24	4,1	15	62,5

TABELLA 2

Sacchi ovigeri di Latrodectus tredecimguttatus *raccolti a S. Marinella (Lazio) e Orbetello (Toscana) dal* 29-7-57 al 25-5-58

Località e data	N.	Con larve di *P. oculatoria*		Con larve di *P. oculatoria* parassitate da *Pedobius*		Con larve di *Malachius*		Numero complessivo di sacchi ovigeri con predatori	
		N. (1)	% rispetto a N.	N. (2)	% rispetto a N. (1)	N. (3)	% rispetto a N.	N. (4)	% rispetto a N.
Orbetello 23/ 8/57 . .	27	1	3	—	—	—	—	1	3
» 4/ 9/57 . .	52	3	5	2	66	—	—	3	5
» 5/ 9/57 . .	70	—	—	—	—	—	—	—	—
» 19/ 9/57 . .	39	6	15	2	33	—	—	6	15
» 18/10/57 . .	49	3	6	2	66	—	—	3	6
» 24/10/57 . .	90	3	3	2	66	—	—	3	3
» 18/11/57 . .	56	5	8	3	60	—	—	5	8
» 23/11/57 . .	168	2	1	1	50	—	—	2	1
» 29/11/57 . .	85	5	3	5	100	—	—	5	3
	636	28	4,4	17	60,7			28	4,4
S. Marinella 29/ 7/57	8	—	—	—	—	—	—	—	—
» 22/ 7/57	39	1	2	—	—	—	—	1	2
» 19/ 9/57	435	—	—	—	—	—	—	—	—
» 30/ 9/57	475	3	0,6	—	—	—	—	3	0,6
» 14/10/57	350	12	3	5	41,4	2	0,5	14	4
» 28/10/57	686	18	2	7	38,8	9	1	27	4
» 14/11/57	633	9	1	5	55,5	2	0,3	11	1
» 3/12/57	541	4	0,7	3	75	1	0,1	5	0,9
» 24/ 2/58	647	5	0,7	2	40	15	2	20	3
» 31/ 3/58	707	3	0,4	1	33,1	10	1	13	1
» 25/ 5/58	950	6	0,6	6	100	18	1	24	2
	5471	61	1,1	29	47	57	1	118	2,1

pezzi boccali circondandoli quasi completamente. Le mandibole sporgono nella apertura boccale solo con le punte sottili ed acuminate, mentre alla base si articolano con gli scleriti dell'endoscheletro peristomale. Il capo e i pezzi boccali presentano varie setole e sensilli la cui forma e disposizione è indicata nella fig. 2.

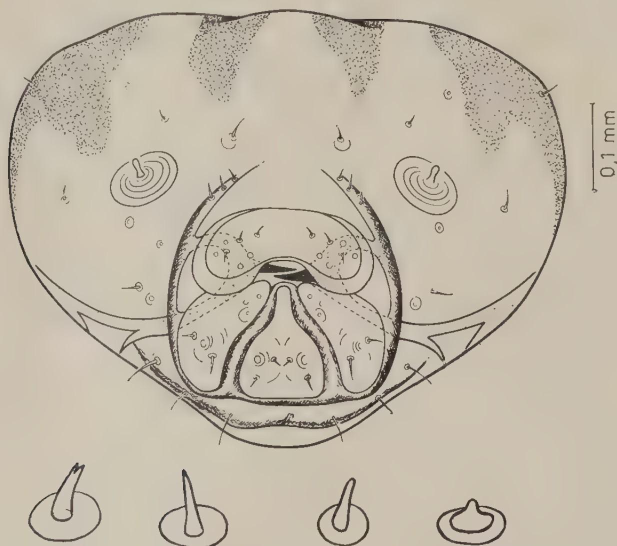


Fig. 2. — *Pimpla oculatoria* F: capo e spine dorsali della larva.

Le larve di *P. oculatoria* succhiano il contenuto delle ova di *L. tredicimguttatus* di cui rimane il corion raggrinzito e accartocciato (Fig. 1). E' facile così constatare che il numero delle ova necessario allo sviluppo di una larva di *P. oculatoria* non è molto elevato. La totale distruzione delle ova di *L. tredecimguttatus* in un sacco ovigero si osserva solo quando il numero di larve presenti è di 6 o 7 (numero massimo osservabile). Quando il sacco ovigero contiene 3 o 4 larve (come alla fig. 1) rimane sempre qualche ovo del ragno non consumato; se poi le larve di *Pimpla oculatoria* sono solo 1 o 2, le ova non attaccate sono in numero ancora maggiore. Poichè ogni sacco ovigero contiene 200 - 300 ova e la distruzione completa si ha solo quando le larve sono 6 o 7, si può molto grossolanamente calcolare che ogni larva consumi 25 - 30 ova.

Comunque, quando la larva ha raggiunto il suo sviluppo, fila un bozzolo

(*) In *P. ovivora* secondo VOUKASSOVITCH esse non superano mai il numero complessivo di 60 per protuberanza, mentre in *P. oculatoria* NIELSEN (citato da VOUKASSOVITCH) rappresenta 60 spine in una sola delle labbra che formano una protuberanza dorsale.

nel quale rimangono aggrovigliati i gusci delle ova consumate e si isola completamente, in modo che i ragni nati da ova non consumate non possano minimamente disturbarle durante la ninfosi.

L'adulto sfarfalla dai sacchi ovigeri producendo dei fori circolari di circa 1 mm. di diametro, difficilmente distinguibili da quelli prodotti dai giovani ragni. Lo sfarfallamento di *P. oculatoria* dai sacchi ovigeri raccolti in inverno si verifica a t. ambiente molto precocemente, cioè tra marzo ed aprile. Le Pimple che ne fuoriescono evidentemente non depongono in altri sacchi ovigeri di *L. tredecimguttatus* (1), questo infatti ha una sola generazione all'anno che inizia tra luglio e agosto, periodo nel quale si raccolgono sacchi ovigeri contenenti quasi esclusivamente ova e raramente ragnetti neonati. In settembre e ottobre invece si trovano molto spesso nei sacchi ovigeri, o ragni di 1° e 2° stadio che ibernano nell'ooteca stessa, o ova embrionate; le quali come ha osservato VOUKASSOVITCH non sono utili per lo sviluppo delle larve di *Pimpla*. Pertanto le larve mature di *P. oculatoria* che si raccolgono da settembre per tutto l'inverno provengono da deposizioni avvenute in estate in sacchi ovigeri contenenti ova del ragno appena deposte e non embrionate, e rappresentano una seconda o una terza generazione; la prima svolgendosi a partire da marzo - aprile presumibilmente in sacchi ovigeri di altre specie di ragni presenti in quel periodo.

Per ciò che riguarda i danni che le larve di *Pimpla* recano ai ragni parassitati, VOUKASSOVITH cita come un'eccezione l'asserzione di LAUBOULBENE, secondo cui tali danni sono da considerarsi trascurabili e fa notare che tutti i sacchi ovigeri di *Epeira* da lui raccolti a Belgrado contenevano solo larve di *Pimpla* e le ova erano tutte distrutte. Ma per avere un'idea dei danni arrecati da *Pimpla oculatoria* occorre evidentemente distinguere tra percentuale di ova distrutte dentro uno stesso sacco ovigero e percentuale di sacchi ovigeri attaccati da *Pimpla*. Quasi sempre il 100/100 della ova contenute in un sacco ovigero è distrutto da 6 o 7 larve di *Pimpla* e solo quando le larve sono 2 o 3 una piccola percentuale di ova non viene attaccata. Ma se si osserva alla Tab. 2 la percentuale di sacchi ovigeri contenenti larve di *Pimpla* in ciascuna raccolta, si conclude che questo Imenottero, almeno nelle località considerate, non può avere grande importanza come causa nemica allo sviluppo numerico del ragno. I sacchi ovigeri di *L. tredecimguttatus* raccolti in 10 diverse località della provincia di Latina tra l'agosto e il marzo del 1954 erano parassitate da *P. oculatoria* in percentuali mai superiori al 3%. Quattro raccolte di sacchi ovigeri ad Orbetello effettuate nel medesimo periodo, più altre 10, tra l'agosto e il novembre del 1957 mostravano percentuali variabili da 1 al 15% (In media 4%). A S. Marinella in 11 raccolte di 300 - 900 sacchi ovigeri ciascuna, effet-

---

(1) VOUKASSOVITCH a Belgrado per osservare le deposizioni di *Pimpla* nate in primavera da sacoli ovigeri di *Epeira* dovette usare sacchi ovigeri di *Lycosa*.

tuate tra luglio e marzo, la percentuale di ooteche contenenti le larve di *P. oculatoria* era al massimo del 3% e in media dell'1,1%.

Gelis niger Brischke

Questa specie è sfarfallata esclusivamente dai sacchi ovigeri di *L. tredecimguttatus* provenienti dall'Istria. La femmina, (fig. 3) come molte specie di questo genere, è attera, mentre il maschio è alato. E' lunga circa 4 mm, ha un

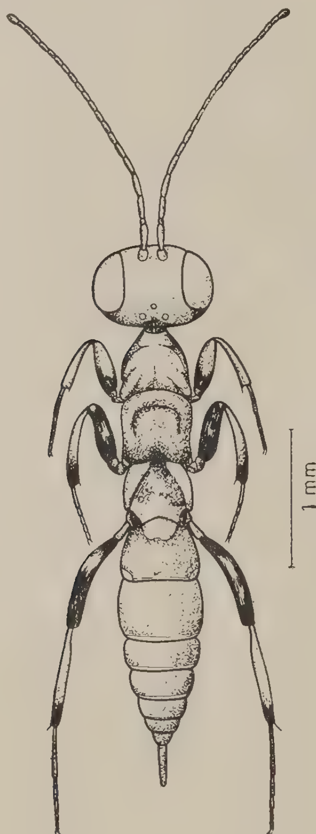


Fig. 3. — *Gelis niger* Brischke (♀).

colore bruno scuro quasi nero sul capo, torace e addome, mentre le antenne hanno un colore bruno più chiaro. Le zampe sono giallo - brune salvo il femore II - III e l'estremità delle tibie II - III nere come il resto del corpo. Il 1° segmento addominale, nero nella sua parte anteriore, presenta posteriormente una larga macchia che si estende nell'urite successivo. Il maschio ha

capo e torace neri, zampe dello stesso colore della femmina, addome con secondo urite interamente giallo.

Le specie del genere *Gelis* (*Pezomachus*) si evolvono a spese di Aracnidi (confronta G. GRANDI) o di Braconidi Microgasterini. Così, ad esempio la larva di un *Gelis* sp., segnalata da HERMES et al. (1) come predatrice in California delle ova di *L. mactans* F., ne distrugge l'intera covata all'interno di ciascun sacco ovigero; mentre i *Pezomachus*: *Heidenreichi* Hab., *instabilis* Forst e *nigritus* Forst sono menzionati da H. BLUNK (1951) come iperparassiti di *Pieris brassicae* in quanto sfarfallati da bozzoli di *Apanteles glomeratus* L. (*Brac. Microgasterinae*). Lo stesso autore (1952 a-b) descrive poi le larve di *Gelis corruptor* Forst, *G. faunus* Forst e di *G. cf. transfuga* Forst di cui illustra lo sviluppo come parassita ectofago di *A. glomeratus* L.

Il materiale proveniente dall'Istria si componeva di 53 sacchi ovigeri di *L. tredecimguttatus* raccolti il 26-11-1954 di cui 26 predati (49,0%). Di questi, 20 presentavano la totale distruzione delle ova e 6 avevano ancora qualche ovo di ragno non attaccato, solo in uno le larve di *Gelis* erano parassitate da *Pedobius* (3,8%). Ciascuno dei sacchi ovigeri predati presentava all'interno da 6 a 12 bozzolini di colore giallo-bruno o giallo zolfo (2) lunghi 7 mm e larghi 2. Nei bozzoli si trovavano delle larve che dopo la pupazione fornivano esclusivamente *Gelis niger*. (47 ♂♂ e 55 ♀♀).

Le larve mature di tale specie (fig. 4 A) sono lunghe 5 mm, larghe 2, la forma del corpo è tozza con segmentazione poco pronunciata. Ciascun urite presenta nella sua porzione dorsale una leggerissima protuberanza munita di spinule e anche il tegumento di tutto il corpo è provvisto di una finissima spinulazione. Il capo (fig. 4 B) è piuttosto largo (0,5 mm di diametro) e circolare. Il labrum ha una forma caratteristica a U, è provvisto di spinule e all'estremità di papille sensoriali; le mandibole sono robuste, di un colore bruno scuro quasi nero, mascelle e labium presentano numerose setole e sensilli disposti come alla fig. 4 B. Larve di questo tipo non sono state mai trovate nei sacchi ovigeri provenienti dal Lazio e Toscana e per quanto riguarda l'Istria

---

(1) Gli stessi A.A. segnalano altri due nemici di *L. mactans*: *Baeus latrodecti* (*Hymenoptera Scelionidae*) e un *Chloropidae* sp. (*Diptera Acaliptera*), i quali entrambi attaccano le ova dentro i sacchi ovigeri. Sempre dalle ooteche di *Latrodectus mactans* sono state ottenute in Argentina due specie di *Tetrastichus* (*Hymenoptera - Tetrastichinae*): *T. abalosi* Bl. e *T. grassoi* Bl. che sarebbero, secondo il BLANCHARD che ne fornisce la descrizione, i soli nemici naturali di *L. mactans* in quella regione.

(2) Il Dr. FERRIÈRE che ha esaminato alcuni di questi bozzoli ci ha avvertiti che si tratta probabilmente di Microgasterini di cui le *Gelis* potrebbero essere i parassiti. Tuttavia all'interno di tali bozzoli non abbiamo trovato alcuna spoglia di larve parassitate, nè ci risulta nella letteratura che vi siano Microgasterini predatodi ova di Ragni. Poichè il materiale che possediamo non ci permette di risolvere la questione, ci ripromettiamo di ritornare sull'argomento se avremo altro materiale dall'Istria o se troveremo la stessa specie in località italiane.

disponiamo purtroppo di una sola raccolta, per cui non sappiamo se la % di sacchi ovigeri distrutti sia così elevata anche in altre località di questa regione.

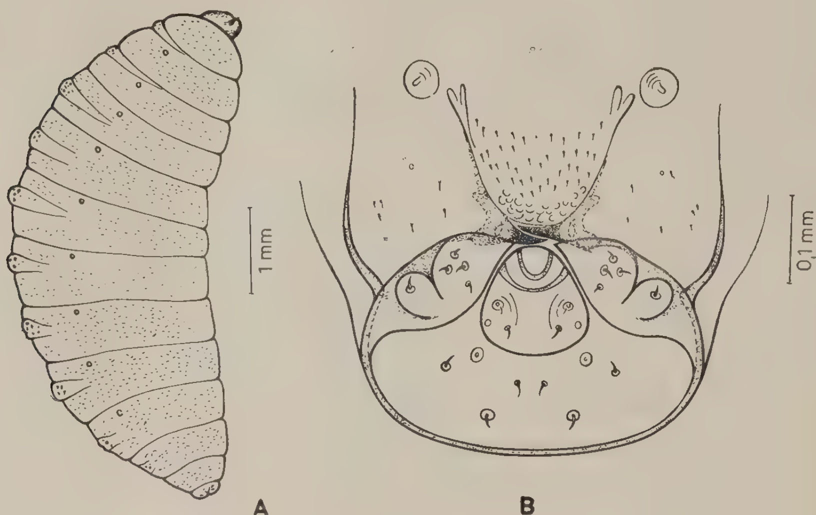


Fig. 4. — *Gelis niger* Br.: A = Larva matura, B = Pezzi boccali.

Pedobius sp.

I Calcididi appartenenti a questo genere parassitizzano Insetti di vari Ordini. Secondo quanto riferisce E Cameron a proposito del *Pedobius* (*Pleurotropis*) *amyntas* Walk che è uno dei parassiti della *Phitomiza ilicis* Curt (*Diptera Agromizidae*) le specie di questo genere « Come parassiti primari, attaccano Lepidotteri, Coleotteri, Imenotteri e Ditteri (specialmente Agromizidi) e come parassiti secondari (iperparassiti) Icneumonidi e Braconidi dei generi *Pimpla* F. e *Apanteles* Forst ». Nikol'skaya M. segnala *Pleurotropis obscuripes* Ratz come parassita di *Apanteles fulvipes* Hald e H. Blunk (1951) cita un *Pleurotropis* sp. tra gli iperparassiti di *Pieris brassicae* insieme ad *Apanteles* e *Pezomachus* (*Gelis*). Il Dr. Ferrière ci ha poi gentilmente informato che i *Pedobius* generalmente sono iperparassiti di diversi Insetti, ma come parassiti dentro sacchi ovigeri di ragni non sono ancora noti in Europa. Un'unica specie negli Stati Uniti il *Pedobius Wilderi* How risulta ottenuta da *Pimpla* (*Tromatobia*) in ooteche di ragni.

Nei sacchi ovigeri di *L. tredecimguttatus* da noi esaminati il parassitismo dei *Pedobius* verso *Pimpla oculatoria* presentava una percentuale quasi sempre molto elevata e in netto contrasto con la scarsa percentuale di sacchi ovigeri contenenti Pimple. Nelle tabelle 1 e 2 sono infatti riportate le percen-

tuali delle larve di *Pimpla oculatoria* parassitate da *Pedobius*. Tali % variano dal 33% al 100% ad Orbetello e S. Marinella nel periodo compreso tra il 29-7-57 e il 25-5-57 e dal 50% al 100% ad Orbetello e Latina tra il 22-10-54 e il 20-3-55.

Nell'ambito di ciascun sacco ovigero quasi sempre si trovano tutte le larve di *Pimpla* distrutte da *Pedobius;* la condizione rappresentata alla figura 1 di una larva di *Pimpla* non parassitata accanto a larve parassitate è molto rara. Ogni larva di *Pimpla* contiene in genere da 20 a 30 larve di *Pedobius;* queste larve distruggono completamente l'ospite e lasciano solo il tegumento dentro il quale rimangono per qualche tempo, finchè lo rompono e ne fuoriescono impupandosi dentro il bozzolo filato dalla larva ospite.

Aprendo un sacco ovigero di *L. tredecimguttatus* (fig. 1) si possono trovare larve di *Pimpla* contenenti dentro il corpo le larve di *Pedobius,* oppure molte piccole larve e pupe di *Pedobius* sparse dentro i bozzoli filati dalle larve di *Pimpla,* delle quali rimane solo il tegumento annerito e raggrinzito (fig. 1). In altri casi poi il sacco ovigero sembra vuoto ma si conosce che conteneva larve di *Pimpla* parassitate da *Pedobius,* dalle spoglie larvali e dai piccoli fori praticati sul sacco ovigero. (Fig. 1).

Le larve mature (Fig. 5 A) di questa specie di *Pedobius* sono lunghe 2,3 mm, larghe 0,8 mm. Esse hanno una segmentazione scarsamente pronunciata, il tegumento del corpo perfettamente glabro e 9 paia di spiracoli nei segmenti 2 - 10. Il capo (Fig. 5 B) ben sporgente dal torace ha una forma semisferica quasi a cupola con un diametro di 0,1 mm, è privo di setole, vi si distinguono solo le antenne e 4 paia di sensilli. Il labrum ha una forma semicircolare con

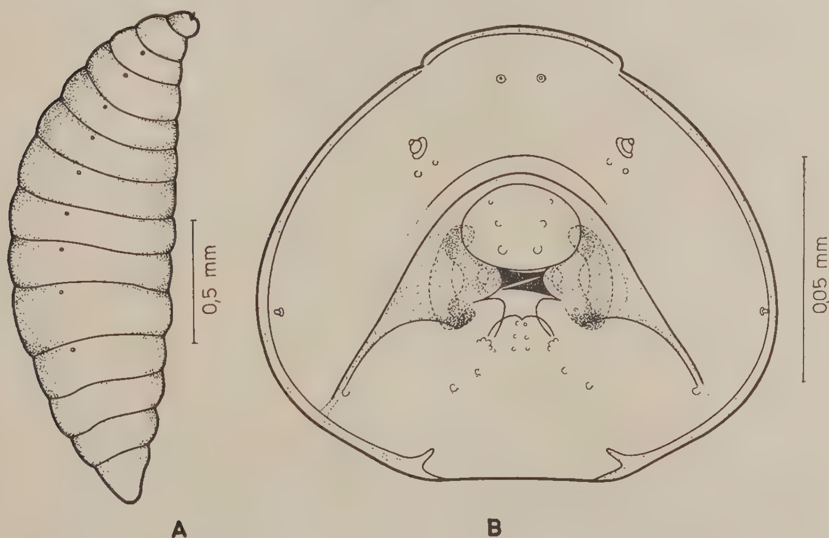


Fig. 5. — *Pedobius* sp.: A = Larva matura, B = Capo visto di fronte.

3 paia di sensilli, altri se ne distinguono nel labium disposti come alla figura 5 b. Le mandibole sono aguzze e robuste e ben pigmentate, esse si articolano alla base con un endoscheletro peristomale appena visibile.

Queste larve che si rinvengono dentro il corpo delle Pimple specialmente nelle raccolte fatte in ottobre si impupano al principio dell'inverno e svernano generalmente in tale stadio. Gli adulti ne sfarfallano a temperatura ambiente tra maggio e giugno; molto più tardi quindi dei loro ospiti. Da ciascun sacco ovigero di *L. tredecimguttatus* sfarfallano in media da 150 a 200 individui. Ogni sacco ovigero contiene infatti 6-7 larve di Pimpla e ogni Pimpla 20-30 larve.

La femmina di queste specie di *Pedobius,* di cui riportiamo una figura (Fig. 6), misura 2 mm di lunghezza e 3,5 di apertura alare. Il corpo ha un colore verde metallico, molto scuro, sul capo, sull'estremità dell'addome e sul

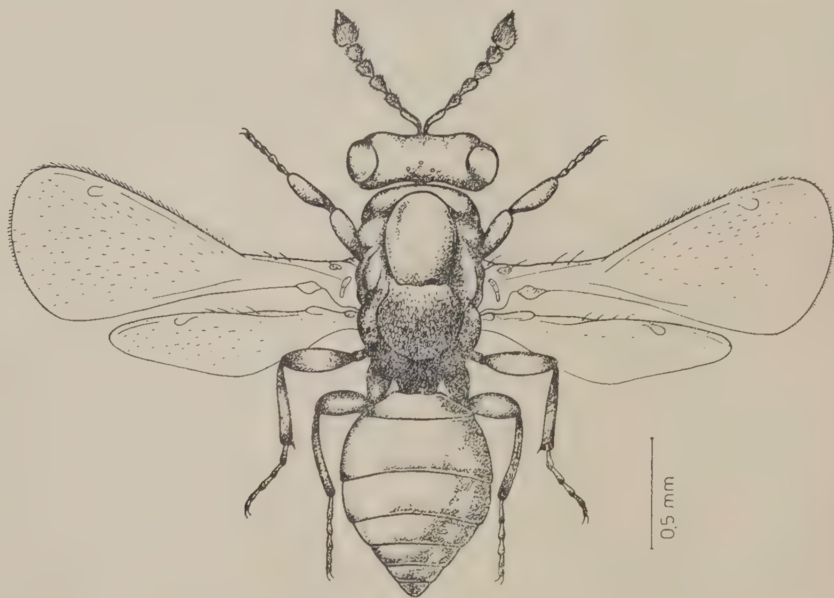


Fig. 6. – *Pedobius* sp. (♀).

propodeo mentre lo scutello e il mesonoto hanno riflessi di un rosso rame. Le zampe sono nere, senza riflessi metallici, con tibie leggermente gialle alla base e le antenne nere sono ricoperte di un fine peluria bianca. Il propodeo, lo scutello e il mesonoto presentano una caratteristica scoltura ad esagoni allungati irregolari.

L'elevata percentuale di parassitismo riscontrata nel Lazio ai danni delle

Pimple che attaccano le ova del ragno ci porta ad ammetere che questa specie in alcune zone favorisca lo sviluppo di *L. tredecimguttatus* distruggendo un suo predatore (1).

Malachius sp.

Le larve e gli adulti (2) di questo genere di Coleotteri Malacodermi sono zoofagi e predatori nel terreno, sotto la scorza degli alberi e sotto le pietre; esse si introducono occasionalmente nei sacchi ovigeri di *L. tredecimguttatus* contenenti giovani ragni da poco fuoriusciti dalle uova, li uccidono afferrandoli con le punte delle mandibole e succhiandoli. Si trovano nei sacchi ovigeri a partire dal mese di ottobre quando cioè le ooteche contengono in prevalenza ra-



Fig. 7. — *Malachius* sp., larva matura.

(1) E' interessante notare che nella raccolta d'Istria dove la percentuale di sacchi ovigeri attaccati da Imenotteri è molto più elevata, solo un sacco ovigero conteneva larve di *Gelis* iperparassitate da *Pedobius*. Il materiale è tuttavia troppo scarso per raggiungere una qualsiasi conclusione in questo senso.

(2) La determinazione degli adulti è opera del Dott. E. De Maggi.

gnetti ibernanti. Dentro ciascuna ooteca si trovano in genere 1 o 2 larve ma in qualche caso anche 4 larve; esse sono circondate da un groviglio di fili di seta ai quali sono attaccate le spoglie dei ragnetti succhiati. Il danno che tali larve fanno ad una popolazione di ragni ibernanti è minimo, come risulta dalla tabella 2, ove si osserva che nella località di S. Marinella tra il 14-10-57 e il 25-5-58 la percentuale di sacchi ovigeri contenenti *Malachius* variava dal 0,3% al 2,%. E' anche importante notare che solo in questa località le ooteche di *L. tredecimguttatus* contenevano larve di *Malachius;* a Latina e ad Orbetello non ne abbiamo trovata alcuna.

Queste larve (fig. 7) misurano circa 10 mm di lunghezza e 2 di larghezza, sono di un colore rosso scuro su tutto il corpo eccetto il capo che è nero e l'estremità dell'addome. Il torace, lungo 3 mm, presenta nel 1° urite 3 larghi rilievi chitinei di colore bruno chiaro e altri due più piccoli nei due uriti successivi. L'ultimo urite addominale ha pure 2 appendici chitinee provviste di setole. Sono larve molto vivaci che appena estratte da una ooteca cercano subito di nascondersi in una qualsiasi anfrattuosità, e di introdursi in altri sacchi ovigeri, cosa che riesce loro facilmente nei sacchi ovigeri che presentano fori di uscita di *Pimpla o Pedobius.* In uno stadio più giovanile dovrebbero essere anche capaci di introdursi nei sacchi ovigeri senza sfruttare dei fori preesistenti perchè talora ve le abbiamo trovate senza che nella superficie esterna fosse possibile notare alcuna soluzione di continuità. Comunque sia, queste larve che normalmente passano l'inverno in varie anfrattuosità del terreno quando riescono a penetrare dentro i sacchi ovigeri vi distruggono tutti i giovani ragni, vi ibernano e verso il mese di marzo si impupano; le ninfe durano circa 15 giorni e alla fine del mese nascono gli adulti.

Altri insetti sfarfallati isolatamente dai sacchi ovigeri

Da una ooteca raccolta a S. Marinella il 31-3-58 insieme a un gruppo di altre 706 (Tab. 2) abbiamo ottenuto in aprile 1 esemplare di *Apanteles* sp. (*Hym. Ichneumonidae*) e 2 di *P. oculatoria.* Da un'altra ooteca raccolta nella stessa località il 14-10-57 (insieme ad altre 349) è sfarfallato 1 esemplare di *Eupteromalus* sp. (*Chalcididae Pteromalinae*) insieme a numerosi altri di *Pedobius* le cui larve avevano completamente distrutto quelle di *P. oculatoria.* Infine da materiale raccolto a Latina nel 1954-55 sono sfarfallati da un sacco ovigero circa 20 piccoli Ditteri Nematoceri della famiglia *Ceratopogonidae.*

Questi dati hanno scarsissima importanza, tuttavia ricordiamo che gli Icneumonidi del genere *Apanteles* sono già noti come nemici di ragni e di altri Insetti (confronta Grandi e Voukassovitch). Gli *Eupteromalus* sono parassiti o iperparassiti di Imenotteri e Ditteri e l'unico individuo sfarfallato in maggio si è sviluppato probabilmente a spese di pupe ibernanti di *Pedobius.*

Conclusione

Le ova di *L. tredecimguttatus* vengono distrutte dalle larve di *Pimpla oculatoria* dentro i sacchi ovigeri. Ogni larva di Pimpla consuma circa 30 ova del ragno. Ogni sacco ovigero contiene al massimo 7 larve. Se il numero è minore rimangono ova non consumate e i ragni che ne fuoriescono restano nella ooteca sino al 2° stadio senza disturbare le larve di Pimpla che prima di ibernare si avvolgono in un proprio bozzolo. Le Pimple sfarfallano tra marzo ed aprile, ma solo in luglio ed agosto trovano sacchi ovigeri di questo ragno con ova non embrionate, in altri periodi dell'anno le ooteche contengono in prevalenza ragni di 1° e 2° stadio o ova embrionate inadatte allo sviluppo delle larve di *P. oculatoria*. Le larve mature di *P. oculatoria* sono a loro volta attaccate dalle larve di un Calcidide del genere *Pedobius* che in numero di 20-30 si sviluppano come endofaghe ai danni di ciascuna larva di Pimpla. Compiuto il loro sviluppo si impupano dentro i bozzoli delle Pimple e in questo stadio passano l'inverno sfarfallando in gran numero (oltre 200 per sacco ovigero) tra maggio e giugno. Qualche sfarfallamento aberrante si verifica anche in ottobre - novembre e attraverso i fori prodotti si introducono nei sacchi ovigeri, larve di Coleotteri (*Malachius* o Dermestidi) o Acari che finiscono di distruggere le ova o i giovani ragni ibernanti eventualmente risparmiati dalle larve di Pimpla.

Oltre agli Insetti sunnominati raccolti tutti in 3 località (S. Marinella, Latina, Orbetello) è da segnalare per Pola (Istria): *Gelis niger* Brs. un Icneumonide predatore o parassita di altri predatori (presumibilmente Microgasterini) dentro i sacchi ovigeri dei *L. tredecimguttatus*.

Per ciò che riguarda la distribuzione dei predatori e parassiti, dall'esame delle tabelle 1 e 2 in cui sono riportati tutti i dati raccolti nelle zone di Latina e nei comuni di Orbetello e di S. Marinella negli anni 1954 - 1958, risulta quanto segue:

1) Nel materiale proveniente da Orbetello la percentuale di sacchi ovigeri contenenti larve di *P. oculatoria* presenta per gli anni 1954 - 55 valori (4,1%) pressochè eguali a quelli per il 1957 (4,4%): Valori % più bassi sono stati riscontrati nel materiale proveniente da Latina (2,0%) e da S. Marinella (1,1%). Tuttavia queste differenze riscontrate nelle zone in esame non sono risultate significative, calcolando infatti il t. di Student tra la media delle percentuali di S. Marinella ($1,1 \pm 0,8$) e di Orbetello ($5 \pm 5,4$) si ottiene: $t = 1,716$ con $P < 0,2$.

2) La percentuale di sacchi ovigeri contenenti larve di *P. oculatoria* parassitate da *Pedobius* risulta pressochè costante sia per il materiale proveniente da Orbetello nel 1954 - 55 (62,5%) e nel 1957 (60,7%) che per quello di Latina (60,0%); minore invece risulta tale percentuale nel materiale di S. Ma-

nella, (47%) ma anche in questo caso le differenze tra le medie di S. Marinella e Orbetello non sono significative ($t = 1{,}44$ con $P < 0{,}2$).

La raccolta ricevuta da Pola (Istria) è l'unica di questa località, tuttavia riveste egualmente un certo interesse. Infatti bisogna osservare che in 35 raccolte effettuate nel Lazio e ad Orbetello la massima percentuale di sacchi ovigeri contenenti predatori (*Pimpla*) era del 18% contro il 49% di Pola, mentre in 22 raccolte nelle stesse località la minima percentuale di parassitismo di *Pedobius* ai danni della Pimpla era del 33%, contro il 3,8% ai danni di *G. niger*. Questo dato perciò anche se isolato è importante in quanto è probabile che si avvicini ad una media della distribuzione notevolmente diversa da quella riscontrata nelle località italiane.

In definitiva ci sembra di poter concludere, che ove i nemici delle ova di *L. tredecimguttatus* siano rappresentati solamente da *P. oculatoria* (a sua volta attaccata da *Pedobius*) e da qualche altro predatore occasionale, non si possa attribuire ad essi che una scarsissima influenza sulla densità di popolazione del ragno; senza tuttavia escludere, che in altre località si verifichino situazioni differenti ad opera di altre specie, che sviluppandosi a spese delle ova, le distruggano in percentuale assai più elevate di quelle da noi riscontrate.

RINGRAZIAMENTI. Ringraziamo anzitutto il Dott. FERRIERE del Museo di Ginevra, il Dott. MASI di Genova e il Dott. DE MAGGI di Roma, per le loro determinazioni e per notizie bibliografiche; un ringraziamento particolare va poi al Dott. Z. MARETIC dell'Ospedale di Pola per averci gentilmente inviato il materiale da lui raccolto.

RIASSUNTO

Sono stati esaminati complessivamente 7.422 sacchi ovigeri di *Latrodectus tredecimguttatus* ROSSI raccolti in quattro località: Latina e S. Marinella (Lazio), Orbetello (Toscana) e Pola (Istria, Iugoslavia). Le ova di *L. tredecimguttatus* sono predate da larve di *Pimpla oculatoria* Grav. (*Icneumonidae*) a loro volta parassitate da larve endofaghe di *Pedobius* sp. (*Hym. Chalcididae*). I sacchi ovigeri di una unica raccolta proveniente da Pola contenevano larve di *Gelis niger* Brs. Sul materiale proveniente da S. Marinella si è osservato che occasionalmente i ragni neonati sono predati da larve svernanti di *Malachius* sp. (*Coleopt. Malachidae*).

Nel presente lavoro viene fornita una illustrazione delle larve dei suddetti predatori e di alcuni degli adulti (*G. niger* e *Pedobius* sp.). In due tabelle vengono riportati il numero totale e le percentuali di sacchi ovigeri predati da *P. oculatoria* e le percentuali di larve di *Pimpla* parassitate da *Pedobius*.

SUMMARY

A total of 7.422 egg sacks of *Latrodectus tredecimguttatus* ROSSI collected in 4 localities, Latina and S. Marinella (Lazio), Orbetello (Tuscany) and Pula (Istria, Jugoslavia), have been examined. Eggs of *L. tredecimguttatus* are attacked by larvae of *Pimpla oculatoria* Grav. (*Hym. Icneumonidae*) which in turn are parasitized by

endophagous larvae of *Pedobius* sp. (*Hym. Chalcididae*). The egg sacks of a single collection from Pula contained larvae of *Gelis niger* Brs. It has also been observed on the material from S. Marinella that occasionally the new-born spiders are attacked by hibernating larvae of *Malachius* sp. (*Colept. Malachidae*. In the present work, drawings of the predatory larvae and of some imagoes (*G. niger* and *Pedobius* sp.) are given. In the two tables the total number and the percentages of the egg sacks attacked by *P. oculatoria* and the percentages of *Pimpla* larvae parasitized by *Pedobius* are reported.

BIBLIOGRAFIA

BETTINI S. (1954): Distribuzione dei casi di latrodectismo in Italia durante gli anni 1949-51. *Rend. Ist. Sup. San.*, *17*, 333-342.

BETTINI S. (1957): Il ragno rosso volterrano e il suo veleno. *Nuova Antologia lett. sc. arti.*, *470*, 134-136.

BIANCHI F. A. (1945): Notes on the abundance of the spiders *Latrodectus mactans*, L. *geometricus* and *Argiope avara*, and their parasites on the Islands of Hawai. *Proc. Hawaii, Ent. Soc.*, *12*, 245-247.

BLANCHARD E. E. (1950): Tres nuevos parasitos de ootecas de arañas. *Ann. Inst. Med. Reg.*, *3*, 45-51.

BLUNK H. (1951): Zur Kenntnis der Hyperparasiten von *Pieris brassicae* L. 3. Beitrag, *Zeit. f. Ang. Ent.* *32*, 335-405.

BLUNK H. (1951a): Zur Kenntnis der Hyperparasiten von *Pieris brassicae* L. 4 Beitrag: *Gelis cf. transfuga* Forst. *Zeit f. Ang. Ent.*, *33*, 217-267.

BLUNK H. (1951b): Zur Kenntnis der Hyperparasiten von *Pieris brassicae L.* 6. Beitrag: *Gelis corruptor* Forst und *Gelis Faunus* Forst. *Beitrag zur Entomologie*, *2*, 94-109.

BOGEN E. e RUSSEL N. (1936): Poisoning poisonous spiders; an experimental investigation in the control of the black widow spider *L. mactans*. *Calif. West. Med.* *45*, 1-7.

CAMERON E. (1939): The holly leaf-miner (*Phytomyza ilicis* Curt) and its parasites. *Bull. of. Ent. Res* *30*, 173-208.

DELLA TORRE (1901-1902): Catalogus Hymenopterorum hucusque descriptorum systematicus et synonymicus.

DOZIER H. (1931): A new Scelionid Egg Parasite of the Black Widow Spider. *Proc. Ent. Soc. Wash.*, *33*, 27.

GRANDI G. (1951): Introduzione allo studio dell'Entomologia. *Ed. Agricole, Bologna.*

HALL D. G. (1937): The North and Central American Spider Parasites of the Genus *Pseudogaurax* (*Diptera, Chloropidae*) *J. Wash. Acad Sci.*, *27*, 255-261.

HERMES W. B., BAILEY S. F. e MC IVOR B. (1935): The Black Widow Spider. *Bull. Calif. Agric. Exp. Sta.*, *591*.

IRWING W. Q. e HINNMAN E. H. (1935): The blue mud-banker as a predator of the Black Widow Spider. *Science*, *82*, 385.

LABOULBENE A. (1871): Note sur les moers de *Pimpla oculatoria*. *Ann. Soc. Ent. Franc.* 444.

NIELSEN E. (1924): Contributions to the life History of Pimple Spider Parasites. *Entomol. Meddelelser, B.*, *14*, 137-205.

NIKOL'SKAYA M. (1934): List of Chalcid flies (*Hym.*) reared in U.S.S.R., *Bull. of Ent. Res.*, *25*, 130-143.

PEMBERTON C. E. (1939): Parasite of Black Widow Spider. *Rep. Comm. Exp. Sta. Hawaii*, 26-27.

PEMBERTON C. E. e ROSA J. S. (1940): Notes on the life history of *Baeus californicus* Pierce, an egg parasite of the Black Widow Spider. *Hawaii Plant Red. 44*, 73-80.

PIERCE W. D. (1939): The Black Widow Spider and its Parasites. *Bull. S. Calif. Acad. Sc.*, *37*, 101-104.

THORP R. W., WOODSON W. P. (1945): Black Widow, America's most poisonous Spider. *Chapel Hill., The University of North Carolina Press.*

VELLARD J. (1936): Le venin des Araignées. *Masson e C., Paris.*

VOUKASSOVITCH P. (1927): Contribution à l'Etude de *Tromatobia* (*Pimpla ovivora* Boh. (*angens* - Grav.), Ichneumonide parasites des oeufs d'araignées. *Bulletin Soc. Zool. France. 2*, 213-286.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 4. - ottobre 1958

RIVISTE SINTETICHE E CRITICHE

LA SIEROLOGIA DELL'AMEBIASI

R. DE BLASI e L. MAGAUDDA - BORZI' (*)

PARTE 1

MODERNE PROSPETTIVE NEL CAMPO PRATICO E DOTTRINARIO

L'amebiasi presenta, nel nostro Paese, quadri clinici particolari, rappresentati, nella maggior parte dei casi, da: coliti subacute o croniche senza diarrea, anzi spesso con predominanza di stipsi, forme oligosintomatiche con saltuarie esacerbazioni, portatori convalescenti o sani.

La forma dissenterica classica acuta, quale si riscontrava, specie nell'Italia meridionale, agli inizi di questo secolo e quale si ritrova, ancor oggi, nei paesi tropicali, è, ormai, molto rara, per non dire, eccezionale.

Appare, pertanto, evidente come la diagnosi clinica rivesta, oggi, una particolare difficoltà e come essa abbia ancor più bisogno dell'ausilio diagnostico del laboratorio.

L'accertamento diagnostico, più comunemente usato, è rappresentato, come è noto, dalla ricerca dei trofozoiti e delle cisti nelle feci.

Non vi è, però, dubbio che tale ricerca rivesta notevole difficoltà e sia soggetta a non infrequenti errori sia per quanto riguarda la tecnica di esecuzione che l'interpretazione dell'esame.

Per quanto riguarda l'esecuzione non è superfluo richiamare l'attenzione sulla necessità di adottare particolari attrezzature (camera di Foot, ad esempio) ed alcune tecniche sulle quali, in epoca recente, BUONOMINI e coll. (1952-1955) hanno particolarmente insistito, riportandone tutti i particolari al fine di una corretta applicazione.

Difficoltà ben maggiori presenta l'esatta interpretazione dell'esame; se è, infatti, relativamente facile porre diagnosi di certezza nella forma acuta di amebiasi in presenza di trofozoiti tipici (forme grandi, vivacemente mobili, ematofaghe, con nucleo caratteristico) non altrettanto può dirsi nelle forme subacute e croniche in presenza di scarsi trofozoiti, spesso di « forma minuta », non ematofagi con movimenti più o meno torpidi. Per i sostenitori della specie apatogena *E. hartmanni* (BRUG, NOL-

---

(*) *Istituto di Igiene della Università di Messina* (Direttore: Prof. R. DE BLASI).

LER, MARQUES DA CUNHA, PROWAZECK) s'impone in questi casi una diagnosi differenziale non sempre facile. BURROWS (1958), del tutto recentemente, afferma che il problema della diffusione dell'amebiasi è stato negli U.S.A. sopravalutato, giacchè molti ricercatori scambiano *E. hartmanni* con «forme nane» di *E. histolytica*.

Si suole in questi casi, e, in particolare modo, nell'esame dei portatori, consigliare la ricerca delle cisti, che, se eseguita correttamente con le metodiche consigliate (BUONOMINI e coll.), ha indubbiamente i seguenti vantaggi:

a) maggior numero di elementi a caratteristiche meglio definite sottoposti ad esame;

b) esclusione di forme che non danno cisti (*D. fragilis*);

c) maggiore quantità di materiale fecale trattato e quindi maggiore facilità di reperti positivi;

d) comodità di esame per il paziente che, pertanto, può essere sottoposto facilmente a ripetute indagini, il che, in alcuni casi, è indispensabile;

e) facile esecuzione di indagini su vasta scala.

La presenza di cisti tetranucleate è sufficiente, secondo la maggior parte dei ricercatori americani, a fare diagnosi di *E. histolytica*.

Non bisogna, però, dimenticare che tale tesi, condivisa da molti AA. tra cui, in Italia, il BUONOMINI, non è da tutti accettata e che molti ricercatori, capeggiati da BRUMPT e seguiti, in Italia, da SCAFFIDI e PENSO, ammettono l'esistenza di una *E. dispar*, pressochè identica morfologicamente ad *E. histolytica*, ma apatogena.

Non vi è dubbio che tale contrasto di opinioni porta conseguentemente ad un criterio diverso d'interpretazione, che può anche falsare le reali condizioni epidemiologiche esistenti in una determinata zona.

Abbiamo già accennato a quanto sostenuto recentemente da BURROWS a proposito della diffusione dell'amebiasi negli U.S.A. e possiamo, ancora, citare le ricerche eseguite dal GRASSO (1933) e dallo SCAFFIDI (1939) a Catania: mentre il primo riportò una percentuale di positività per *E. histolytica* del 35%, lo SCAFFIDI ottenne valori pari all'1,6%.

Tali profonde divergenze, non rare a verificarsi, hanno indotto numerosi AA. (FAUST, CRAIG, PERRY, BOZICEVICH, SCAFFIDI, BUONOMINI, D'ALESSANDRO), sia nel passato che nel presente, a richiamare l'attenzione sulla difficoltà dell'interpretazione dei reperti microscopici per la diagnosi morfologica di *E. histolytica*.

CRAIG (1942), a tale proposito, dice testualmente di non credere che nella *E. histolytica* che egli stesso vede.

Le difficoltà su prospettate ci spiegano la ricerca di sempre nuove metodiche atte ad offrirci un giudizio diagnostico più preciso e sicuro di quello che si può ottenere con l'esame morfologico.

Tra queste metodiche è utile ricordare l'isolamento in terreni colturali e le prove di patogenicità in animali sensibili.

Circa l'esame coprocolturale BUONOMINI e RICCIARDI (1955) hanno richiamato l'attenzione sull'utilità della coltura delle feci ai fini della diagnosi d'infezione amebica, proponendo che essa entri nell'uso corrente a fianco degli altri metodi di indagine finora usati.

La pratica della coprocoltura su terreno di Boeck e Drbohlav e, ancor meglio, su terreno di Balamuth e Sandza, presenta, infatti, il vantaggio di poter escludere, nel giro di tre giorni, le amebe (*Endolimax nana, Iodamoeba butschlii, Dientamoeba fragilis, Entamoeba coli*) diverse da *E. histolytica*, in quanto *non coltivabili su detti terreni*. Mette, del pari, in grado di differenziare le «razze piccole» dalle «razze normali» di *E. histolytica*, giacchè le prime avrebbero la caratteristica di conservarsi più difficilmente nelle colture, esaurendosi dopo 5 o 6 trapianti.

Per quanto riguarda le prove di patogenicità in animali sensibili, alla vecchia me-

todica dell'inoculazione del materiale fecale nel retto del gattino si sono sostituite quelle più moderne e più precise dell'infezione endocecale del ratto (NEAL; NEAL e KENT; OKAMOTO; ROGOVA; JONES; DE CARNERI) e dell'infezione intraepatica del criceto (THOMPSON e coll.; NEAL; DE CARNERI) con amebe coltivate.

A questo proposito DE CARNERI (1958) propone uno «screening» dei ceppi sospetti, la cui esecuzione consta di quattro fasi:

1) invio di colture con i ceppi sospetti a Istituti specializzati;

2) determinazione del livello di infezione (A.D.I. = average degree of infection) mediante infezione endocecale di almeno 10 ratti giovani. Ceppi con alto livello d'infezione vanno considerati come patogeni in fase virulenta;

3) infezione intraepatica seriale (da 5 a 10 passaggi), nel criceto, dei ceppi avirulenti;

4) coltura delle amebe e, quindi inoculazione endocecale in 10 ratti. I ceppi che, dopo tale trattamento, non risultano patogeni per il ratto debbono essere considerati stabilmente non patogeni.

A parte la difficoltà pratica di tale metodica che richiede laboratori specializzati, a noi sembra che la laboriosità dell'indagine, soggetta alle influenze più varie proprie delle prove biologiche, non sempre potrà consentire un chiaro discernimento tra ceppi apatogeni e patogeni.

Rimarrebbero, poi, molti fondati dubbi nei casi non accertati per impossibilità tecnica (virulentazione della flora batterica associata durante i passaggi seriali nel fegato) e, senza dubbio, anche in quei casi nei quali non si riuscisse a dimostrare la patogenicità del ceppo.

La non rara incertezza del responso coprologico e le difficoltà delle prove colturali e, ancor più, delle biologiche, che richiedono, entrambe, laboratori specializzati, ha diretto le indagini verso le metodiche di indole sierologica.

E' sorta, in tal modo, la «*sierologia dell'amebiasi*», che sebbene sia, allo stato attuale, ancora non sceverata in tutti i suoi aspetti e in tutte le sue possibili applicazioni, ha, tuttavia, le basi dottrinarie e pratiche per un futuro, non lontano, progresso.

Vorremo, a tal proposito, fare una distinzione, in genere tralasciata dai ricercatori che si sono occupati dell'argomento, tra ricerche sierologiche a scopo che, potremo chiamare, *ameba-diagnostico* e ricerche a scopo *siero-diagnostico*.

Questa distinzione ci sembra di una certa utilità giacchè tiene a sottolineare un aspetto della sierologia dell'amebiasi, a nostro avviso, importantissimo; l'*ameba-diagnostico*, in genere del tutto trascurato e affrontato in modo molto vago e impreciso.

I) LA SIEROLOGIA DELL'AMEBIASI A SCOPO AMEBA - DIAGNOSTICO.

Dobbiamo, purtroppo, riconoscere che, a tutt'oggi, molto poco sappiamo sulla struttura antigene di *E. histolytica* e sulla eventuale esistenza di «razze» o «tipi» sierologici. Si suppone, addirittura, una diversità antigene tra stipite e stipite di *E. histolytica* (BOZICEVICH 1950, 1951); impiegando come antigene per prove di deviazione del complemento due ceppi diversi (103 e 104), BOZICEVICH dimostrò, infatti, che il loro comportamento non era sovrapponibile, annoverandosi un buon numero di soggetti che, negativi con l'uno erano positivi con l'altro antigene e viceversa.

Si ha, certamente, fondato motivo di supporre che la cellula protozoaria, ancora più complessa ed evoluta della cellula batterica, possieda antigeni di gruppo e antigeni di specie e tipo-specifici; le indagini, però, nel campo di *E. histolytica* e di altre specie o generi di amebe sono ancora frammentarie e non hanno, a tutt'oggi, portato ad alcuna acquisizione definitiva, specie nel campo pratico.

COLONNELLO, in un suo recente lavoro (1958), fà giustamente rilevare tale lacuna lamentando che « alla prima fase dell'individuazione e classificazione delle amebe con criteri strettamente morfologici non ne sia seguita una seconda di classifica sierologica, che avrebbe forse permesso di risolvere, in via diretta o indiretta, i vari problemi legati alla infettività e virulenza del protozoo ».

Possiamo, tuttavia, ricordare le indagini di FULTON, JOYNER e PRICE (1951) i quali mediante la preparazione di antisieri per *E. histolytica* e per *E. coli* hanno, per primi, messo in evidenza reazioni crociate tra le due specie di amebe, pur essendo il titolo di anticorpi verso lo stipite omologo considerevolmente più alto dell'eterologo.

A risultati pressochè identici perviene GOLDMAN (1953-54) nelle sue interessanti ricerche mediante l'impiego di antisieri coniugati a fluorescina. L'uso di tale metodica, che merita la più attenta considerazione, ha permesso, inoltre, all'A. di distinguere ceppi di *Dientamoeba fragilis, Endolimax nana e Entamoeba invadens* da ceppi di *E. histolytica* e di *E. coli*. Ancor più interessanti i risultati ottenuti con le cosidette « razze piccole » di *E. histolytica* che reagiscono scarsamente con un siero coniugato anti - *histolytica*; ciò fà supporre, con tutta probabilità, che tra « razze piccole » e « razze grandi » di *E. histolytica* vi siano differenze più sostanziali e importanti che che non quelle relative alla semplice dimensione.

Gli studi sull'argomento sono ancora all'inizio ma già promettono fecondi risultati. La eventuale differenziazione sierologica delle varie specie di amebe e, molto probabilmente, di stipiti della stessa *E. histolytica* potrà avere, oltre i riflessi dottrinari, riflessi veramente preziosi nel campo pratico dell'accertamento diagnostico.

II) LA SIEROLOGIA, DELL'AMEBIASI A SCOPO SIERO - DIAGNOSTICO.

Non vi è dubbio che la ricerca dei vari anticorpi (agglutinanti, devianti il complemento, immobilizzanti) nell'amebiasi abbia basi immunologiche.

I fondamenti immunologici della deviazione del complemento in detta malattia sono stati ampiamente illustrati da CRAIG (1948) e sottoscriviamo completamente con lui nel ritenere il fenomeno di natura strettamente specifica. Altrettanto può dirsi per la reazione d'immobilizzazione espressione di reazione antigene - anticorpo « in vitro », in analogia a quanto osservato nel campo batterico e, più recentemente, per il *Treponema pallidum* (test di NELSON e MAYER).

Non ci dilungheremo sulle acquisizioni nel campo dell'immunità, sia innata che acquisita, nell'amebiasi, giacchè detto argomento è stato oggetto di una esauriente relazione di D'ALESSANDRO al Congresso di Malattie Infettive nel 1954.

Per quanto riguarda la immunità acquisita che è quella che, nel nostro caso, più ci interessa abbiamo, invero, dati molto modesti. Contro l'opinione dei vari trattatisti secondo i quali non sarebbe dimostrabile nell'amebiasi una immunità acquisita essendo il soggetto guarito dall'infezione suscettibile ad altra successiva infezione, contratta a breve o lunga scadenza, stanno le ricerche sperimentali di SWARTZWELDER e MULLER (1950), i quali hanno visto che ratti vaccinati con materiale amebico presentano maggiore resistenza all'inoculazione sperimentale rispetto ai ratti di controllo. Ci sembra, anche, opportuno ricordare come, secondo ZIRONI, l'instaurarsi di uno stato immunitario nelle forme morbose protozoarie, in genere, sia confermato dalla cronicità di molte di esse.

I dati in nostro possesso non ci permettono sostenere che il movimento anticorpale che, con ogni probabilità, si instaura, anche se in misura più o meno modesta, nell'amebiasi, abbia valore difensivo; ci sembra, però, lecito affermare che agli anticorpi antiamebici possa attribuirsi significato diagnostico.

Dopo aver premesso queste fondamentali acquisizioni dottrinarie ci sembra opportuno richiamare l'opinione di CRAIG (1948), il quale afferma che la diagnosi sierologica di amebiasi potrà essere di prezioso ausilio nei seguenti casi:

1) diagnosi di portatori di cisti tetranucleate;
2) diagnosi dell'ascesso amebico del fegato;
3) diagnosi della dissenteria amebica acuta e, in particolar modo, cronica;
4) controllo del trattamento terapeutico e valutazione dei farmaci antiamebici.

La sierologia dell'amebiasi a scopo sierodiagnostico si avvale di molte reazioni, anche se non tutte sullo stesso piano per facilità di esecuzione e per sensibilità dei risultati.

Volendo elencare le più note, esse sono:

1) la deviazione del complemento;
2) l'agglutinazione dei trofozoiti;
3) l'agglutinazione delle cisti;
4) la prova di precipitazione;
5) la prova di immobilizzazione;
6) l'intradermoreazione.

Premesso che nessuna delle reazioni sopraelencate dà garanzia di positività nel 100% dei casi, si può dire che la reazione, a tutt'oggi, più studiata e che ha trovato maggiore applicazione è la deviazione del complemento. Tale reazione è stata, però, eseguita nella maggior parte dei casi senza la necessaria uniformità d'indirizzo per cui vi è da registrare, e come giustamente fa rilevare D'Alessandro, una difformità degli antigeni adoperati, una difformità del processo di esecuzione, una difformità del materiale clinico sperimentato. Il problema è, pertanto, così complesso e degno di studio da meritare una particolare trattazione; ci limiteremo, per ora, a riferire sulle altre prove.

Agglutinazione dei trofozoiti.

E' stata tentata da Leal ed Amaral (1952), usando come antigene una ameba a vita libera *E. moshkovskii*, coltivata nel liquido di Amaral (An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, *21*, 175, 1945) per 2-5 giorni. Il sedimento, ottenuto nel liquido di coltura, filtrato e centrifugato a 1.500 g. p m.. (3-5 minuti) per tre volte, era ripreso in soluzione fisiologica. Le tecnica della reazione consisteva nel mettere a contatto il siero in esame, fresco e portato alle diluzioni volute, con la sospensione dei trofozoiti, in parti eguali (cc. 0,1) e, dopo aver ben miscelato mediante una bacchetta di vetro, lasciare a 37° C. per un'ora. Si eseguivano controlli usando al posto del siero soluzione fisiologica. L'agglutinazione, osservata al microscopio, avveniva dopo 5-10 minuti; dopo 20-40 minuti si aveva la lisi se il siero era stato usato fresco, mentre non si verificava se i sieri erano stati inattivati per mezz'ora a 56°C. Dal complesso delle prove eseguite su 20 sieri gli AA. concludono affermando che non vi è correlazione alcuna tra la agglutinazione di *E. m.* e la infezione con *E. h.*

Agglutinazione di cisti.

E' stata tentata da Greif (1950), usando cisti di *E. histolytica*, ottenute dal ceppo MRS, coltivato in terreno all'uovo solido + Locke. L'incistamento era ottenuto «in vitro» ponendo colture di amebe di 48 ore di sviluppo in tubi contenenti amido di riso; dopo 72 ore il sedimento, lavato per tre volte in soluzione fisiologica, era ripreso

in soluzione di solfato di zinco (D: 1,13). Dopo centrifugazione il supernatante, ricco di cisti, veniva diluito con soluzione fisiologica e sottoposto a nuova centrifugazione; il sedimento, così ottenuto, era, infine, usato per la prova.

Volendo ottenere la sterilizzazione del sedimento l'A. consiglia un trattamento con bicloruro di mercurio 1:50.000 per 50 minuti; è necessario, in tal caso, rilavare il sedimento per tre volte in soluzione fisiologica.

Per la esecuzione della prova si mettevano a contatto cc. 0,02 di sospensione di cisti e cc. 0,02 di siero in esame (previamente trattato per 30 minuti a 56°C.) su un vetrino, posto dentro una scatola di Petri sul cui fondo era tenuta della carta bibula umida per evitare l'essiccamento. Si teneva il termostato a 37° C. per un tempo oscillante tra 30 minuti e due ore, agitando ogni 15 minuti circa. L'agglutinazione si manifestava, in genere, entro questo tempo e si poteva renderla ancora più evidente tenendo il vetrino successivamente in ghiacciaia a + 4°C. per un tempo oscillante tra le 8 e le 40 ore.

E' stato eseguito un numero ancora troppo esiguo di prove per potere dare qualche giudizio sulla reazione in parola; dai primi risultati ottenuti dall'A., sembra però, che non vi sia un netto rapporto tra positività della agglutinazione e presenza di parassitismo intestinale; come, del pari, con la positività della reazione di deviazione del complemento.

Prova di precipitazione.

Studiata in un primo tempo, da WAGNER e BIELING (1934) è stata messa a punto da MOAN (1957) in questi ultimi anni.

E' stato usato il ceppo di *E. histolytica* NIH-103, coltivato in terreno speciale (*). L'antigene, preparato con una tecnica particolare dai Mobac Laboratories (Pennsylvania), veniva tenuto a 37°C. per 15 minuti prima dell'uso. Su una lastra di vetro fornita di pozzetti si ponevano a contatto cc. 0,05 di siero, perfettamente limpido e cc. 0,05 di antigene, agitando continuamente la miscela per almeno 4 minuti (120 colpi al minuto).

La lettura si eseguiva al microscopio basandosi per l'interpretazione sulla quantità e sulla grossezza dei precipitati formatisi.

Prove eseguite dalla MOAN su circa 2.400 sieri hanno messo in luce un alto grado

---

(*) Il terreno consiste in:

— fegato concentrato gr. 2,00;
— fosfato bisodico gr. 2,09;
— potassio acido fosfato gr. 1,6;
— cloruro di sodio gr. 3,00;
— bacto proteose peptone gr. 1,67;
— acqua distillata q. b. a 1.000 cc.

Mescolare, far bollire e raffreddare a t. a. ed aggiungere mgr. 100 di colesterolo (sol. al 2% in acido acetico). Distribuire in tubi in quantità pari a 10 cc. Sterilizzare a 120° per 15 minuti. Due o tre giorni prima dell'uso aggiungere a ciascun tubo cc. 0,5 di una sospensione sterile di riso in acqua al titolo di gr. 0,50 per 10 cc. Conservare a t. p. per due o tre giorni per controllare eventuale inquinamento. Conservare a fresco. Il terreno in tubi ben chiusi dura anche un mese.

di specificità e la quasi totale assenza di reazioni falsamente positive, specialmente quando si usa siero perfettamente limpido.

Il test è risultato frequentemente negativo nei casi di dissenteria amebica acuta e nei casi di portatori asintomatici, mentre ha presentato una positività dell'85% circa allorquando vi era invasione di tessuti ed una positività, addirittura, del 100% (5 casi positivi su 5 esaminati) nell'ascesso epatico di natura amebica.

Mc Hardy (1957) riferisce su alcune prove eseguite con questo test usando un antigene ricavato dal ceppo SN-61-b. Sono stati esaminati 8 soggetti affetti da forme dissenteriche acute (5 furono negativi), 12 da forme croniche (5 negativi); 38 portatori sani: « cyst - passer ». (21 negativi); 6 affetti da forme extraintestinali trattate chirurgicamente (5 negativi); 62 pazienti con feci negative per *E. histolytica* da almeno sei mesi (39 negativi) ed, infine, 25 controlli sani (4 false positività).

L'A. dichiara di aver seguito per la valutazione dei risultati il criterio della stessa Moan e conclude affermando che la prova, che ha suscitato tanto interesse in America, non può essere considerata, sulla base dei risultati da lui ottenuti, superiore agli altri test sierologici in quanto non può darci sicuro affidamento diagnostico sia nella amebiasi intestinale che extra.

Con un antigene non ben specificato Villari e Digilio (1955) hanno eseguito prove di precipitazione, usando sia la reazione zonale che di flocculazione e mettendo a contatto cc. 0,5 di siero e cc. 0,5 di antigene (lettura dopo 15-30 minuti fino a 12-24 ore). Non hanno ottenuto risultati positivi in nessuno dei sieri saggiati (di cui 20 di individui affett da colite amebica).

Prova di immobilizzazione.

La dimostrazione che nell'infezione luetica si producono anticorpi capaci di immobilizzare *Treponema pallidum* (test di immobilizzazione di Nelson e Mayer) suggerì a Cole e Kent (1953) di tentare eguale prova nell'amebiasi .

E' stato usato il ceppo di *E. histolytica* 2.000 del National Microbiological Institut, coltivato in terreno all'uovo + Locke, in associazione ad una flora batterica mista (*C. xerosis*, in predominanza, uno streptococco alfa emolitico ed un batterio del gruppo *Achromobacter*).

Per la preparazione degli immunsieri sono stati inoculati dei conigli per via endovenosa con sospensioni amebiche dello stesso ceppo 2.000, coltivato, però, in associazione con *T. cruzi*, onde evitare risposte immunitarie legate alla flora batterica associata.

Per il test di immobilizzazione le amebe venivano raccolte dal sedimento di varie colture di 24 ore nella quantità di cc. 0,5 per tubo. I sedimenti, mescolati in un unico tubo, erano tenuti in termostato per 3 ore a 37°C. Durante la prima mezz'ora di permanenza in termostato, dopo avere eseguito un'accurata miscela dei trofozoiti, si eseguiva il conteggio in camera di Neubauer, in modo da ottenere una diluizione finale pari a 200.000 elementi per cc.

Per l'esecuzione del test cc. 0,05 di sospensione di amebe e cc. 0,05 del siero in esame venivano posti su un vetrino copri - oggetto, trattato con « petrolatum », per evitare lo scorrimento ed ottenere una parziale anaerobiosi, e mantenuto in termostato a 37°C. Si eseguiva un controllo ad intervalli da 5 minuti a 4 ore, segnando i trofozoiti mobili tra i primi 25 elementi osservati nel campo microscopico. Il calcolo della percentuale di amebe mobili (%) veniva fatto secondo la formula seguente: $B - A \times \frac{100}{B}$, in cui B = numero trofozoiti trovati mobili nel siero normale di controllo; A = numero trofozoiti trovati mobili nella prova con siero immune.

Nelle prove con siero immune la immobilizzazione dei trofozoiti avveniva, in ge-

nere, entro i primi 20-30 minuti, gli elementi cessavano di emettere pseudopodi e tendevano ad assumere forme tondeggianti e contratte.

La prova su descritta è stata applicata da COLE e KENT all'esame di tredici pazienti affetti da amebiasi: 5 reagirono positivamente, pur dando una reazione più debole rispetto ai siero immuni. Prove di controllo eseguite su 48 individui sani non diedero false positività.

BROWN e WHITBY (1955) ripresero la prova di immobilizzazione usando sospensioni di amebe con titoli oscillanti tra 200.000 e 400.000 trofozoiti per cc. Essi esaminarono, con la identica tecnica su descritta, i sieri di 25 pazienti (di cui 23 sicuramente amebiasici e 2 sospetti), ottenendo risultati positivi in 6 casi, dubbi in 3 e negativi in 16 (tra questi ultimi i due casi sospetti). La immobilizzazione avvenne dopo 30 minuti circa e gli AA. considerarono i risultati positivi quando ebbero almeno il 70% d'immobilizzazione. Le prove di deviazione del complemento, condotte in parallelo, diedero esito positivo solo in 3 casi: in 2 che avevano risposto positivamente al test d'immobilizzazione ed in 1 che aveva reagito negativamente.

I risultati ottenuti portano gli AA. ad affermare che il test d'immobilizzazione non sembra mostrare sensibilità e specificità maggiori della deviazione del complemento.

In Italia VALENTINO (1956) ha lavorato sulla prova in oggetto, usando un ceppo di *E. histolytica* denominato «D», coltivato in terreno di Boeck e Drbolaw con penicillina, in associazione a *B. coli* e *Ps. aeruginosa*.

La tecnica seguita dall'A. è stata la seguente: cc. 0,05 di siero in esame (inattivato per 30 minuti a 50°C.) viene posto a contatto con cc. 0,05 di una coltura di *E. histolytica*, ricca di trofozoiti mobili, su un vetrino porta-oggetti, ricoperto con un vetrino copri- paraffinato ai bordi. Il vetrino viene tenuto in camera di Foot a 37°C., eseguendo direttamente al microscopio la lettura ogni 10 min. su 100 trofozoiti e considerando come definitivo il risultato ottenuto dopo un'ora. Si eseguono prove di controllo con sospensione amebica con liquido di Locke tenuta nelle stesse condizioni della prova per stabilire il grado d'immobilizzazione spontanea. Il calcolo viene eseguito secondo la seguente formula:

$$\frac{\text{Mobilità controllo} - \text{Mobilità siero esame}}{\text{Mobilità controllo}} \times 100 = y$$

in cui y è l'indice di immobilizzazione.

Studiando l'andamento della reazione VALENTINO ha potuto confermare alcuni dati riferiti dagli AA. che si sono occupati in precedenza della prova.

La esposizione del siero a 56°C. per 30 minuti non modifica il potere immobilizzante del siero, che si altera, invece, per una esposizione a 63°C. per 30 minuti.

Un siero immune perde la sua capacità immobilizzante a concentrazioni ancora abbastanza elevate: essa, già bassa alla diluizione 1 : 8, non è, infatti, più osservabile ad 1 : 16.

VALENTINO ha, inoltre, dimostrato come il potere immobilizzante di un immunsiero non venga modificato dall'assorbimento con una sospensione costituita dalla flora batterica associata al ceppo di *E. histolytica* usato.

Un punto sul quale i risultati della VALENTINO non concordano perfettamente con quelli di COLE e KENT e di BROWN e WHITBY è rappresentato dal tempo di contatto tra siero ed amebe per la immobilizzazione; mentre, infatti, gli AA. succitati affermano che l'immobilizzazione avviene entro i primi 30 min. e che, in seguito, i trofozoiti riacquistano rapidamente la loro mobilità, VALENTINO ha notato che il fenomeno, pur avendo la sua maggiore evidenza tra i 20 e i 60 minuti, persiste ancora per otto ore.

Detto A. ottiene risultati soddisfacenti sia con sieri immuni che con sieri di soggetti amebiasici; in entrambi i casi il trofozoita, oltre a perdere i movimenti, assume forma rotondeggiante e mette in evidenza il nucleo e la parete cellulare.

Le prove comparative tra il test d'immobilizzazione e la reazione di deviazione del complemento (antigene Lilly, tecnica di Kolmer) eseguite su 57 sieri di individui affetti d'amebiasi, controllata con l'esame delle feci, hanno dato, risultati nettamente superiori per il primo.

La deviazione del complemento ha dato, infatti, reazione positiva in 35 sieri (in 24 ad alto titolo) mentre la prova d'immobilizzazione ha risposto positivamente in 50 sieri (in 27 con valori oscillanti tra il 75% ed il 100%, in 23 con valori tra il 40% ed il 75% ed in 3 con valori inferiori al 30%). In 22 soggetti non affetti da amebiasi la prova d'immobilizzazione è risultata negativa o ha dato valori molto bassi (in un solo siero si è avuta una percentuale d'immobilizzazione del 23%).

Sulla base dei dati ottenuti VALENTINO ritiene sufficiente una percentuale di amebe immobilizzate del 40% per considerare positiva la reazione, al contrario degli AA. che hanno considerato necessaria una percentuale non inferiore al 70%.

Intradermoreazione.

Tentata per la prima volta da SCALAS (1923) fu eseguita con un antigene preparato nel seguente modo gr. 30 di muco o di pezzi di mucosa (tratti da amebiasici acuti) erano addizionati con cc. 50 di soluzione fisiologica in una bottiglia contenente palline di vetro, che veniva tenuta per una settimana a 37°C. avendo cura di agitarla spesso durante la giornata. Dopo filtrazione per carta bibula e per candela Berkefeld il filtrato, decolorato mediante carbone animale, era ulteriormente sterilizzato e conservato in recipiente sterile.

La prova consisteva nell'iniettare cc. 0,25 di detto antigene nel terzo medio della faccia estensoria dell'avambraccio, procedendo nell'identico modo nell'altro braccio con soluzione fisiologica come controllo.

La reazione positiva portava, dopo un'ora, alla formazione di un grosso ponfo impiantato su una zona di cute rossa, succulenta, di circa 5-6 cm. di diametro. Il processo, che si manifestava con senso di prurito e di calore nella zona, scompariva lentamente in due o tre giorni. Nei casi negativi si aveva, invece, un rossore fugace che si dileguava rapidamente.

La prova eseguita su 9 pazienti, con diagnosi accertata coprologicamente, diede risultato nettamente positivo (reazione oltre 2-3 giorni) in 5 casi, mentre negli altri si ebbe reazione debole con durata oscillante tra le 7 e le 12 ore. Controlli eseguiti su 5 individui sani, su 8 pazienti affetti da enterocolite non amebica e su altri 11 soggetti affetti da malattie varie diedero tutti esito negativo.

I risultati di SCALAS non furono confermati da SPECTOR (1932) e, più recentemente da SECRET (1952), benchè prove intradermiche eseguite negli animali da vari AA. (SELLARDS, 1911; HEATHMAN, 1932, MENENDEZ, 1932; BIELING, 1935) avessero dato risultati incoraggianti (citati da LEAL 1953).

LEAL (1953) riprese le esperienze in campo umano allestendo un antigene preparato con vari ceppi di *E. histolytica* e di *E. moshkovskii.*

L'antigene, sterilizzato per Seitz, era preparato dai trofozoiti disintegrati in agitatore elettrico, sospesi in soluzione fisiologica addizionata di mertiolato 1 : 10.000 e posti a 37°C. Come controllo era usato un antigene preparato nell'identico modo dai batteri associati alle amebe. Per la prova era introdotto cc. 0,1 di antigene per via intradermica eseguendo la lettura dopo 24 ore.

La reazione positiva dava, anche nelle prove di LEAL, un eritema del diametro

di circa 8-10 cm., essa iniziava normalmente dopo 3 ore (eccezionalmente dopo 20 minuti), raggiungendo il massimo dopo 24 ore e scomparendo tra le 24 e le 48 ore.

I risultati delle prove eseguite su 141 soggetti (nei quali era stato contemporaneamente eseguito l'esame coprologico), misero in evidenza, da un lato, il costante parallelismo tra la positività dell'intradermoreazione e la presenza del protozoo nelle feci e, dall'altro, l'identità della reazione con i ceppi di *E. histolytica* e di *E. moshkovskii* usati.

In epoca più recente VILLARI e DIGILIO (1955) hanno eseguito prove intradermiche iniettando cc. 0,30 di un antigene, prodotto dall'Istituto Pasteur, nella faccia volare dell'avambraccio di 40 soggetti (20 affetti da colite amebica, 10 da coliti non amebiche e 10 controlli sani).

I controlli erano eseguiti con un antigene preparato dai batteri simbionti, forniti, anch'esso, dall'Istituto Pasteur. L'eritema si aveva quasi istantaneamente (5 minuti) e si protraeva anche per 12-48 ore (gli AA. tenevano conto delle reazioni protratte tra le 12 e le 48 ore). Nei 20 soggetti affetti da colite amebica ebbero 18 casi positivi (in sedici di questi si ebbe, però, reazione positiva anche con il controllo), nei soggetti con colite non amebica e nei controlli sani ebbero rispettivamente 4 e 2 casi positivi sia con l'antigene amebico che con quello di controllo.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Dalla osservazione critica dei lavori sopra riferiti si possono trarre alcune considerazioni e prospettare alcuni problemi relativi alla odierna sierologia dell'Amebiasi.

Ci preme, anzitutto, sottolineare il duplice aspetto sotto il quale deve essere oggi riguardata la sierologia dell'amebiasi, l'aspetto cioè *ameba-diagnostico* e quello *siero-diagnostico.*

Per quanto riguarda il primo non possiamo non riconoscere che il campo è ancora poco indagato e che scarse sono le nostre conoscenze sulla struttura di *E. histolytica* e di altre amebe a carattere più o meno saprofitario.

Mentre alcune indagini, ancora all'inizio (GOLDMAN), sembrano prometterci lusinghieri risultati nella differenziazione sierologica di *E. histolytica* da altre specie amebiche, non mancano risultati discordi che ci lasciano molto perplessi nella interpretazione. Vale, a tal proposito, ricordare i risultati ottenuti da LEAL con *E. histolytica* ed *E. moshkovskii* in prove d'agglutinazione e d'intradermoreazione: mentre con le prime non fu possibile mettere in evidenza alcuna correlazione tra le due specie di amebe, con le seconde. lo stesso A., ottenne, invece, risultati positivi.

Tali discordanze sono un'ulteriore prova della necessità dello studio accurato sulla struttura antigene delle amebe e, in particolar modo, di *E. histolytica*, per la quale si prospetta, addirittura, la probabilità di una struttura antigene individuale diversa da stipite a stipite.

Le conoscenze più approfondite in tale campo dovrebbero essere la premessa necessaria per poter utilizzare l'esame sierologico, a somiglianza di quanto avviene per numerose specie batteriche, per il riconoscimento delle specie amebiche. Si potrebbe avere in tal modo un prezioso ausilio all'esame coprologico, che non infrequentemente presenta dubbi ed errori, ed all'esame colturale e biologico, che non sempre può essere eseguito da tutti i laboratori.

Un sussidio relativamente semplice quale potrebbe essere quello sierologico sarebbe, come giustamente fa rilevare D'ALESSANDRO, molto gradito specie a quei laboratori meno addestrati alla identificazione delle amebe e noi pensiamo che la *prova d'agglutinazione* sui trofozoiti o sulle cisti potrebbe essere la più indicata a questo scopo.

Si tratta, come si è visto, di una ricerca delicata la cui tecnica va ancora meglio studiata e potenziata e benchè essa abbia dato risultati molto modesti o addirittura negativi nella sierodiagnosi di Amebiasi, riteniamo, tuttavia, che possa essere utilizzata, forse proficuamente, per la tipizzazione sierologica delle specie amebiche.

D'altro canto, la conoscenza della struttura antigene di *E. histolytica* e di altre specie amebiche costituisce la promessa indispensabile per il perfezionamento delle tecniche e, in modo particolare, della preparazione degli antigeni atti alla sierodiagnosi dell'amebiasi.

Sappiamo, infatti, come la risposta immunitaria nella malattia in parola non sia, in genere, molto rilevante e necessitiamo, pertanto, di antigeni altamente sensibili e specifici.

Per quanto riguarda l'aspetto sierodiagnostico del problema si è visto, infatti, come le prove, oggi più comunemente usate, abbiano dato, in mano ai vari ricercatori, risultati ancora contrastanti e che lasciano, invero, molte perplessità.

L'orientamento delle tecniche sierologiche verso la deviazione del complemento, sulla quale si riscontra nella letteratura una così rilevante mole di lavori da consigliarci un esame approfondito a parte sull'argomento, è tornato un po' a detrimento delle altre tecniche non tentate o sperimentate solo da pochi ricercatori.

Esclusa la prova d'agglutinazione sia dei trofozoiti che delle cisti che, come si è detto, potrebbe essere più indicata a scopo amebo-diagnostico, a noi sembra che le prove di precipitazione e d'immobilizzazione meritino di essere oggetto di attento studio e di essere sottoposte a prove comparative con la reazione di deviazione del complemento.

Non vi è dubbio che la prova di precipitazione presenta maggiore facilità di esecuzione del test d'immobilizzazione, potendosi, anche al momento attuale, reperire l'antigene in commercio; essa ha dato, però, in mano ai pochi AA. che l'hanno eseguita, risultati che lasciano perplessi circa la sua sensibilità e specificità e merita pertanto di essere più profondamente e più intensamente indagata.

La prova d'immobilizzazione sembra, invece, fornire risultati più sensibili e specifici; essa, pur avendo presentato nelle mani della Valentino, una netta superiorità rispetto alla deviazione del complemento, attende, però, come è logico, una più vasta conferma.

Non si può, però, non riconoscere come detta prova sia più indaginosa e richieda un'attrezzatura ed una metodica di laboratorio non sempre alla portata di tutti.

Circa l'intradermoreazione, che è indubbiamente la prova più semplice, i risultati, ottenuti dai vari ricercatori che si sono occupati dell'argomento, sono, in linea di massima, incoraggianti e fanno pensare ad una sua possibile applicazione pratica.

Indubbiamente tale prova avrebbe, più che significato clinico, valore epidemiologico e potrebbe essere applicata in indagini di massa per il *depistage* di eventuali portatori. Non ci risulta che siano state eseguite indagini in tal senso e crediamo che la prova meriti, pertanto, d'essere ulteriormente sperimentata.

Concludendo ci sembra di poter affermare che esistono le premesse per un sicuro progresso della sierologia dell'amebiasi sia nel suo aspetto amebo-diagnostico che siero-diagnostico.

Possediamo, infatti, diverse prove: agglutinazione, deviazione del complemento, precipitazione, immobilizzazione, intradermoreazione, che meritano di essere ancor meglio studiate e perfezionate, onde poterle applicare, nel modo più utile, sia in un campo che nell'altro.

E' nostro convincimento, in accordo a D'Alessandro, che il progresso deve sopratutto venire dal perfezionamento delle tecniche di preparazione e di estrazione degli antigeni. Non vi è dubbio, infatti, che quando si potrà disporre di antigeni purificati ed altamente sensibili e specifici al posto di quelli rudimentali e molto spesso empirici, usati a tutt'oggi, avremo realizzato un passo decisivo nella sierologia dell'amebiasi.

II

LA DEVIAZIONE DEL COMPLEMENTO

Nella prima parte ci siamo trattenuti sulle più moderne acquisizioni nel campo della sierologia dell'Amebiasi sotto il duplice aspetto: *amebo-diagnostico* e *siero-diagnostico*.

Nel passare in rassegna le varie metodiche proposte, volutamente tralasciammo di prendere in considerazione la *deviazione del complemento* (r.d.c.) giacchè la imponente mole di lavoro sull'argomento meritava una messa a punto particolareggiata.

Passando, infatti, in rassegna i numerosi lavori, sia italiani che stranieri, sulla r. d. c. nell'Amebiasi colpisce l'assoluta mancanza di una uniformità d'indirizzo, che si ripercuote, come è logico, sui risultati ,difficilmente sovrapponibili tra loro, e ci spiega le notevoli discordanze riscontrabili tra i vari AA. che si sono occupati dell'argomento. Mentre, infatti, alcuni considerano la r. d. c. dotata di alta sensibilità e specificità, altri, invece, negano ad essa qualsiasi valore diagnostico e la ritengono, pertanto, inadatta ad entrare nella *routine* di laboratorio.

In contrapposto ai risultati negativi di DOPTER (1905), che fu il primo ad occuparsi di r. d. c. nell'Amebiasi, abbiamo, infatti, quelli molto brillanti di IZAR (1914): tale contrasto si è ripetuto tra i ricercatori che si sono susseguiti e che hanno confermato i risultati ora di DOPTER ora di IZAR.

Tra coloro che, in accordo a DOPTER, negano qualsiasi valore alla r. d. c. possiamo ricordare: VON HAGE (1920); PAULSON e ANDREWS (1938); MAGATH e MELENEY (1940); DOLKART e KULLEN (1951); HUSSEY e BROWN (1950); MAC DEARMAN e DUNHAM (1952); ecc.

Tra coloro che, in accordo ad IZAR, hanno avuto risultati positivi (SCALAS, 1925; SPECTOR, 1932; MENENDEZ, 1932; SCHERWOOD e HEATHMAN, 1952; TSUCHIYA, 1934; SHIRAOGAWA, 1935; STONE 1935; AMARAL, 1944; ecc.) meritano particolare menzione CRAIG (1927), il quale fu tra i primi ad ottenere un antigene da colture di *E. histolytica*, rendendo, in tal modo, più pratica la reazione, e BOZICEVICH (1943) e REES (1950) che, in epoca più recente, hanno apportato ulteriori modifiche e perfezionamenti sia alla tecnica di preparazione degli antigeni che alla tecnica di esecuzione della r. d. c.

Anche i ricercatori italiani, che hanno lavorato sullo argomento dopo IZAR, mostrano opinioni contrastanti: mentre, infatti, RITA (1947) ritiene la r. d. c. sufficientemente sensibile e specifica (richiama, però, l'attenzione su sieri Wassermann positivi che possono dare reazioni aspecifiche), VILLARI e DIGILIO (1955) e PETRINI (1956) danno un giudizio completamente negativo. La stessa VALENTINO (1956), che ha sperimentato la r. d. c. in parallelo allo prova di immobilizzazione, pur riconoscendo ad essa una certa sensibilità, ritiene che sia inferiore al test d'immobilizzazione.

Come si è detto, le discordanze su lamentate sono in gran parte da imputare alla notevole difformità d'indirizzo seguito per queste ricerche: da una attenta osservazione dei lavori sull'argomento appare, infatti, evidente la grande diversità delle tecniche usate, sia per quanto riguarda la preparazione degli antigeni che la esecuzione della reazione, come pure il criterio non sempre uniforme adottato nella valutazione dei casi clinici o nell'accertamento diagnostico.

Anzichè fare una arida esposizione dei lavori, ci sembra utile riportare, quanto più schematicamente possibile, in una tabella (vedi tabella 1) i principali elementi ricavati dalle ricerche dei numerosi AA. che si sono occupati dell'argomento.

Siamo stati costretti ad escludere dalla nostra tabella qualche dato, a nostro avviso, di notevole importanza, quale, ad esempio, quello relativo al ceppo di *E. hi-*

stolytica usato nella preparazione degli antigeni, giacchè ci sarebbe stato possibile trarlo solo da pochissimi lavori.

La stessa tecnica di esecuzione r. d. c., che a noi sembra un elemento di fondamentale importanza, non viene sempre riferita o viene descritta in modo impreciso, tanto che per molti lavori siamo stati costretti a lasciare in bianco il dato in parola.

Per non parlare, poi, di alcuni lavori che abbiamo escluso completamente dalla tabella in quanto i risultati erano riferiti in maniera tale da rendere impossibile la rilevazione di quasi tutti gli elementi da noi presi in considerazione.

Appare evidente, dall'osservazione dei dati riportati nella tabella 1, come i risultati contrastanti, ottenuti non infrequentemente dai vari ricercatori, siano dovuti, sopratutto, alla grande variabilità negli antigeni adoperati, nella tecnica di esecuzione della r. d. c. e nel materiale clinico sperimentato.

Ci sembra, pertanto, utile esaminare, in modo dettagliato, questi tre punti, causa di così frequente divario, passando, prima, in rassegna ciò che è stato fatto sull'argomento e prospettando, poi, alcuni aspetti del problema che meriterebbero, a nostro avviso, di essere ulteriormente indagati al fine di rendere la r. d. c. più sensibile e specifica.

I) Preparazione degli antigeni per la r. d. c. nell'Amebiasi.

Per renderci conto di ciò che è stato fatto in questo campo ci sembra, anzitutto, utile, riassumere le tecniche adoperate dai vari ricercatori per la preparazione degli antigeni:

1) Izar (1914): estratto acquoso di feci di amebiasici in fase acuta da pus di ascessi amebici;

2) Tribondeau e Fischer (1916): pus di ascesso amebico;

3) Scalas (1921): aggiunge a gr. 30 di muco o pezzi di mucosa di ammalati di amebiasi cc. 50 di soluzione fisiologica, in bottiglia contenente palline di vetro, che viene tenuta a 37° C. per una settimana, agitando più volte al giorno. Filtra per carta e poi per candela Berkefeld. Dopo aver decolorato con carbone animale, sterilizza per tindalizzazione;

4) Craig (1927 e succ.): addiziona il sedimento, ottenuto da colture di *E. histolytica* in terreno di Boeck - Drbohlav, con alcool etilico in proporzione variabile da 1,5 a 10 volte il volume del sedimento raccolto. Dopo aver tenuto a 37° C. per 10-15 gg., agitando numerose volte, filtra per carta;

5) Sherwood e Heathman (1931): usano un procedimento alquanto complesso di estrazione con etere, alcool ed acetone (antigene lipoideo colesterinizzato), partendo da sedimento essiccato di amebe. Tale procedimento risulta identico a quello usato da Kolmer per la preparazione dell'antigene per la R. W. partendo da cuore di bue;

6) Tsuchiya (1933): lava le colture otto volte consecutive con soluzione fisiologica ed aggiunge ad un volume di sedimento 10 volumi di alcool assoluto, tenendo a 37°C. per 5 gg. e agitando parecchie volte al giorno. Filtra per carta e conserva in ghiacciaia.

Prepara un altro antigene essiccando 10 cc. del suddetto estratto alcoolico e riportando a volume con soluzione fisiologica;

7) Spector (1932): riprende il sedimento, già lavato con soluzione fisiologica, con alcool in ragione di 1: 10. Prepara un secondo antigene essiccando il primo e risospendendo in soluzione fisiologica in ragione dell'1%;

8) Weiss e Arnold (1934): ricoprono il sedimento, ottenuto da colture di *E. histolytica*, con acetone e pongono a 37°C. fino ad essiccazione. Il residuo secco,

TABELLA N. 1

Principali dati relativi ai lavori eseguiti sulla reazione di deviazione del complemento nell'Amebiasi.

Autori	Anno	Terreno colturale (*)	Tipo di antigene (**)	Tecnica della r. d. c. (***)	Numero totale soggetti esaminati	Diagnosi clinica soggetti esaminati	Accertamento coprologico			Positività della r.d.c.
							positivo	negativo	non riferito	
CRAIG	1928	BD	alcoolico	W	225	24: Amebiasi intestinale 201: Non amebiasici	24	201		24 4
CRAIG	1929	BD	»	W	623	65: Amebiasi intestinale 1: Amebiasi extraintest. 561: Non amebiasici	65	561		61 0 6
CRAIG	1930	BD	»	W	689	82: Amebiasi intestinale 607: Non amebiasici	82	607		77 7
SHERWOOD, HEATHMAN	1931	BD / CC	lip deo colesterinizzato	W	135	12: Amebiasi intestinale 123: Non amebiasici	9	8	3 115	9 7
CRAIG	1933	BD	alcoolico	W	1010	167: Amebiasi intestinale 1: Amebiasi extraintest. 841: Non amebiasici	167	841		157 0 18
TSUCHIYA	1933	SC	alcoolico, acquoso	—	153	6: Amebiasi intestinale 8: Portatori asintomatici 139: Non amebiasici	6 8	139		5 8 4
MAGATH, MELENEY	1940	BD	alcoolico	—	90	73: Amebiasi intestinale 17: Portatori asintomatici	73 17			30 1
REES, BOZICEVICH, REARDON, JONES	1942	Stone	criolisato	—	101	20: Amebiasi intestinale 4: Amebiasi extraintest. 77: Non amebiasici	20	66	11	11 4 6
BOE	1945	CC	acquoso, alcoolico	W	121	5: Portatori asintomatici 116: Non amebiasici	5	116		1 1
RITA	1947	//	alcoolico	—	63	61: Amebiasi intestinale 2: Amebiasi extraintest.	61			56 2
TERRY, BOZICEVICH	1948	BD	acquoso	B	15	6: Amebiasi intestinale	6			

FULTON, JOYNER, PRICE .	1951	BD	criolisato	—	265	83: Amebiasi intestinale 182: Non amebiasici	83	40	142	83 8
BUCHMAN, KULLMAN, MARGONIS	1952	—	HWD	LBR	614	64: Amebiasi intestinale 550: Non amebiasici	64	550		22 48
ELSDON-DEW, MADDISON .	1952	BD	criolisato	F	28	28: Amebiasi extraintest.				28
KENNEY	1952	BD	»	K	303	29: Amebiasi intestinale 274: Non amebiasici	29	274		22 12
LIPPI, CAPOCACCIA, CAO-PINNA	1952	—	alcoolico	K/B	100	27: Amebiasi intestinale 1: Amebiasi extraintest. 3: Portatori asintomatici 69: Non amebiasici	27 1 3	15	54	12 1 0 24
MC DEARMAN, DUNHAM	1952	—	HWD	KBR	2592	187: Amebiasi intestinale 22: Amebiasi extraintest. 2383: Non amebiasici	187	2383		32 19 16
STEIGMANN, SHLAFS ecc.	1952	—	alcoolico	B	110	62: Amebiasi intestinale 48: Non amebiasici	62	48		48 8
VILLARI, DIGILIO . . .	1955	—	alcoolico	K	96	20: Amebiasi intestinale 76: Non amebiasici	20	56	20	12 35
HEINZ, BRAUNS, MAC NAB	1956	BD	ultrasuoni	K	62	8: Amebiasi intestinale 11: Amebiasi extraintest. 43: Non amebiasici	8		43	0 11 0
WELLES	1956	BD	alcoolico	K	134	9: Amebiasi intestinale 3: Amebiasi extraintest. 6: Portatori asintomatici 116: Non amebiasici	9 6	48	68	4 2 0 17
PETRINI	1956	—	alcoolico	K	117	10: Amebiasi intestinale 9: Portatori asintomatici 98: Non amebiasici	10 9	98		9 0 19

Le sigle indicano:
(*) : BD = Boeck e Drbolahv; CC = Cleveland e Collier; SC = SC con brodo, riso, carbone e terreno all'uovo di Dorsett.
(**) : H.W.D. = Hynson, Westcott, Dunham.
(***) : W = Wasserman; B = Bozicevich; BKR = Bukant, Kent, Rein; F = Fulton; K : Kolmer. Il trattino significa non specificato.

trattato con alcool assoluto per 2 settimane a 55°C., viene filtrato e concentrato per evaporazione;

9) STONE (1935): pone cisti lavate, ottenute nel terreno di Stone, in alcool assoluto in bottiglia di vetro con palline. Dopo aver tenuto due ore in agitazione ed una settimana a t. a. agitando frequentemente filtra per carta;

10) CRAIG e SCOTT (1935): trattano con alcool assoluto muco, ricco di amebe, ottenuto da cani infettati sperimentalmente. Diluiscono per l'uso con 3/5 di soluzione fisiologica;

11) REES e BOZICEVICH et alii (1942): coltivano in terreno di Stone per 72 ore ed eseguono il conteggio dei trofozoiti in camera di Naubauer sul sedimento lavato tre volte con liquido di Locke, ottenendo un titolo pari a 600.000 - 4.000.000 di elementi per cc. Congelano ponendo in ghiaccio secco per 4 ore, scongelano rapidamente e tengono per una notte a 10°C. Chiarificano quindi il criolisato per centrifugazione a 15.000 gpm e conservano a —10°C.;

12) BOE (1945): dopo aver lavato per 8-10 volte il sedimento, ottenuto da colture in cl. C., essicca e distribuisce in fialette, riprendendo con soluzione fisiologica al momento dell'uso;

13) RITA (1947): riprende il materiale muco-ematico (proveniente da individui affetti da Amebiasi acuta) con 7 parti di alcool assoluto e, dopo aver tenuto per 15 gg. a 45°C. agitando frequentemente, filtra per carta;

14) TERRY e BOZICEVICH (1948): colture di trofozoiti, posti in tubi da dialisi ben chiusi, sono tenute in fiasche con terreno B. D. a 37°C. per 144 ore. Al materiale, contenente amebe vive, lisate e prodotti metabolici, viene aggiunto, quindi, mertiolato e si conserva in ghiacciaia per tre giorni. Si centrifuga a 15 mila gpm per 15 minuti. Si riporta ad isotonicità con cloruro di sodio e, dopo aver aggiunto mertiolato alla concentrazione finale di 1:1.000 si conserva in ghiacciaia;

15) HUSSEY e BROWN (1950); BUCHNAM, KULMANN, MARGONIC (1952); MAC DEARMAN, DUNHAM (1952); SCHUBERT e MAY (1952); HALL e CARRUTHERS (1957): usano l'antigene di Hynson, Westcott e Dunham (H. W. D. = estratto acquoso di un ceppo di *E. histolytica* (103) coltivato in presenza di una sola specie batterica, secondo REES);

16) FULTON, JOYNER, PRICE (1951): Il sedimento ottenuto da colture in B. D. di 72 ore, viene lavato per centrifugazione a 300 gpm per 5 minuti e risospeso in soluzione fisiologica fosfatata secondo KREBE e EGGLETON. Dopo ulteriore lavaggio e conteggio delle amebe in camera di Thomas, il sedimento, sospeso in acqua distillata, è sottoposto per tre volte al congelamento ed al disgelo;

17) ELSDON - DEW, MADDISON (1952): il sedimento, ottenuto da colture in Locke-siero-uovo di 48 ore, è lavato per centrifugazione a 250-400 gpm. Dopo aver eseguito il conteggio portandolo al titolo di 750.000 elementi per cc. si congela e scongela rapidamente, centrifugando poi ad alta velocità per due ore e filtrando il supernatante per Seitz;

18) KENNEY (1952): il sedimento, raccolto da parecchi tubi di coltura, viene congelato e scongelato rapidamente e ripetutamente. Si centrifuga a 4°C. a 4.500 gpm per un'ora; il supernatante, centrifugato a 0°C. a 18.000 gpm per 30 minuti, viene dializzato in acqua corrente e in acqua distillata. Si porta, quindi, ad isotonicità e si aggiunge mertiolato 1 : 1.000 conservando a —18°C.;

19) DESCHIENS e PORIER (1952): il sedimento, ottenuto da trofozoiti in coltura, sospeso in soluzione fisiologica, lavato, viene essiccato sotto vuoto in acido solforico o in stufa a 37°C o per liofilizzazione a —15°C. Il materiale essiccato viene tritato, pesato ed addizionato di alcool assoluto (da 10 a 100 cc. di alcool per 1 gr. di pol-

vere. Si tiene per 20' a 37°C. agitando spesso, indi si filtra ed evapora ad un terzo del volume iniziale fino a comparsa di un lieve precipitato. Si riprende con alcool assoluto riportando alla metà del volume iniziale;

20) Lippi, Capocaccia e Cao-Pinna (1952); Steigmann, Shlaes, Mintzer, Schaefer (1952); Villari e Digilio (1955); Petrini (1956); Lewin (1956); Hall e Carruthers (1957): usano l'antigene fornito dalla Casa Lilly (estratto alcoolico);

21) Heinz, Brauns, Mac Nab (1956): il sedimento, ottenuto da colture di trofozoiti, viene lavato e sottoposto a trattamento con ultrasuoni in ragione di 800 Kc. e 3 Ws/SQ/cmq. del cristallo di contatto per un totale di 20 W. per 20 minuti. Si filtra, poi, per Seitz;

22) Wells (1956): il sedimento, ottenuto da colture di trofozoiti in terreno B. D., lavato numerose volte con soluzione fisiologica, viene posto a sedimentare spontaneamente per 2 minuti, ripetendo l'operazione una seconda volta sul supernatante (in tal modo si allontana la maggior parte del riso ed i detriti grossolani). Si centrifuga l'ultimo supernatante raccolto per 7 minuti a 2.500 gpm. ed il sedimento, diviso in parti eguali, è ripreso rispettivamente con alcool assoluto e soluzione fisiologica formolata (estratto alcoolico ed acquoso). Si tiene per 24 ore a 37°C. e per 3 gg. a 4°C. agitando spesso, indi si centrifuga ed il supernatante viene conservato per l'uso in ghiacciaia.

Dalla osservazione delle metodiche impiegate dai vari ricercatori, che si sono occupati dell'argomento, appare possibile, pur tra una così grande varietà di tecniche, riportare tutti gli antigeni, fin'oggi usati, a cinque tipi fondamentali:

1) *estratto alcoolico* (Craig; Stone; Craig e Scott; Rita; Wells; antigene della Lilly Company usato da: Hall e Carruthers; Lippi, Capocaccia e Cao-Pinna; Villari e Digilio; Petrini; Steigmann - Shlaes - Mintzer - Schaefer; Lewin);

2) *estratto acquoso* (Terry e Bozicevich; antigene di Hynson, Westcott e Dunham, adoperato da: Hussey e Brown; Buchman - Kullman e Margonis; Mac Dearman e Dunham; Schubert e May; Hall e Carruthers);

3) *criolisato* (Rees e Bozicevich; Fulton - Joyner e Price; Kenney; Elsdon - Dew - Maddison; Schubert e May);

4) *trattato con ultrasuoni* (Heinz, Brauns e Mac Nab);

5) *tipi vari* (Boe; Deschiens e Porier).

Ciascun tipo ha dato, in mano ai vari AA., risultati più o meno discordi che ci sembra utile riassumere in modo schematico:

1) *estratto alcoolico*:

Risultato positivo: Craig (positività dell'85% nell'amebiasi conclamata; del 70-80% nell'amebiasi asintomatica o latente; falsa positività nella colite ulcerosa cronica); Rita (positività del 92% nella amebiasi intestinale); Lewin (positività del 76%; falsa positività nel 3%; risultati dubbi nel 15%); Steigman (positività dell'80%; falsa positività del 6%; falsa negatività del 14%);

Risultato negativo o debolmente positivo: Wells; Lippi, Capocaccia e Cao-Pinna; Villari e Digilio; Petrini. E' da notare che i suddetti AA. hanno usato l'antigene preparato dalla casa Lilly, la quale ci ha dato, del tutto recentemente, comunicazione di averlo ritirato dal commercio a motivo degli scarsi risultati ottenuti;

2) *estratto acquoso*:

Risultato positivo: Terry e Bozicevich (positività del 91%, nessuna falsa positività); Hussey e Brown (antigene H.W.D.: positività dell'82% nell'amebiasi epati-

ca); MAC DEARMAN e DUNHAM: antigene H. W. D. (positività dell'86% nell'amebiasi extraintestinale);

Risultato negativo o debolmente positivo: HUSSEY e BROWN: antigene H.W.D. (negatività del 97,6% nell'amebiasi intestinale asintomatica o sintomatica); MC DEARMAN e DUNHAM: antigene H.W.D. (positività del 15% nell'amebiasi intestinale, risultati dubbi nel 0,7%); BUCHMANN, KULMAN e MARGONIS: antigene H.W.D. (positività del 38%, falsa positività dell'8,8%);

3) *criolisato*:

Risultato positivo: FULTON, JOYNER e PRICE (positività del 100% nell'amebiasi accertata clinicamente con esame coprologico; nessuna falsa positività); KENNEY (potività del 77% nell'amebiasi intestinale; falsa positività del 2,5%); ELSDON - DEW e MADDISON (positività del 63% nell'amebiasi intestinale, del 96% nell'ascesso epatico; nessuna falsa positività); ELSDON - DEW (positività del 60% nell'amebiasi intestinale acuta e del 100% nell'ascesso epatico);

4) *antigene trattato con ultrasuoni*:

I risultati ottenuti da HEINZ, BRAUNS e MAC NAB, che sono a tutt'oggi gli unici ad aver preparato il suddetto tipo di antigene, non sono ancora sufficienti a dare un criterio orientativo. Sembra essersi ottenuta un'alta positività nell'ascesso epatico mentre si sono avuti risultati negativi nell'amebiasi intestinale.

La breve disamina sull'argomento non sembra superflua giacchè essa ci permette alcune considerazioni di non scarso interesse. Appare, infatti, chiaro come i vari tipi di antigene non presentino un eguale grado di sensibilità e come tra essi, quello che sembra dare risultati più probativi, sia l'antigene preparato mediante criolisi, che ha trovato il maggior accordo tra i ricercatori che l'hanno adoperato.

Ma il dato, a nostro avviso, di maggiore interesse che si può trarre dalle osservazioni su riferite, è la necessità di ottenere antigeni ancor più sensibili e specifici, giacchè risulta evidente come la maggiore o minore sensibilità dei vari tipi di antigeni usati sia, in gran parte, legata alla forma clinica dei soggetti presi in esame. Mentre, infatti, tutti i tipi di antigene mostrano, più o meno, un'alta percentuale di positività nell'amebiasi extraintestinale, nella quale è da tutti ammesso un notevole movimento immunitario, non così avviene nell'amebiasi intestinale, sia conclamata che asintomatica, nella quale il movimento immunitario è, indubbiamente, più modesto e necessita, pertanto, di antigeni più sensibili e più specifici per svelarlo. Purtroppo noi possediamo a tutt'oggi antigeni rudimentali, preparati ancora molto empiricamente. Come giustamente fa osservare D'ALESSANDRO, « la deviazione del complemento nell'amebiasi è, oggi, ad uno stadio riportabile approssimativamente alla R. W. al tempo in cui si impiegava l'estratto di fegato sifilitico ».

La preparazione degli antigeni, secondo i metodi soprariportati, può rappresentare solo il primo passo indispensabile ad estrarre dal corpo del protozoo la maggior quantità possibile di materiale antigene grezzo; si tratta, indubbiamente, di un passo molto utile, i cui risultati potranno essere meglio valutati in base a prove comparative che, a tutt'oggi, mancano. Sarebbe, però, errato, considerare con ciò chiuso il problema: esso va, infatti, affrontato sotto molti altri aspetti tutti meritevoli di attento studio al fine di poter ottenere un antigene altamente sensibile ed efficiente non solo nell'amebiasi extraintestinale ma anche nelle forme intestinali sia conclamate che asintomatiche.

A nostro avviso i punti che meritano ulteriori indagini sono i seguenti:

1) il numero degli stipiti di *E. histolytica* da impiegare per la preparazione dell'antigene;

2) il terreno colturale più idoneo;
3) l'associazione batterica più adatta;
4) la tecnica da adottare per la preparazione dell'antigene;
5) la tecnica da adottare per la titolazione dell'antigene.

1) *Il numero degli stipiti di* E. histolytica *da impiegare per la preparazione degli antigeni.*

Come abbiamo avuto più volte occasione di dire la nostra conoscenza sulla struttura antigene di *E. histolytica*, premessa necessaria alla risoluzione di questo e di molti altri aspetti del problema, è molto vaga e non permette, invero, di pronunciarci in merito. Molto discordi sono i risultati dei vari ricercatori che hanno usato antigeni preparati con altre specie di amebe, come, ad esempio, *E. moshkovskii;* a noi sembra che in mancanza di uno studio completo sulla struttura antigene dei vari generi e delle varie specie di amebe e sugli eventuali rapporti di parentela intercorrenti, sia consigliabile ricorrere a stipiti di *E. histolytica*. In considerazione, poi, dell'ipotesi, ventilata da alcuni AA., circa la probabile diversità antigene da stipite a stipite di *E. histolytica*, sarebbe, a nostro avviso, più prudente, in attesa che meglio si chiarisca il problema, ricorrere ad antigeni polivalenti, preparati con quattro-cinque ceppi, scelti preferibilmente tra quelli isolati nella propria zona, o almeno, nel proprio paese.

2) *Il terreno colturale più idoneo.*

Un terreno particolarmente adatto alla coltivazione di *E. histolytica* allo scopo della preparazione degli antigeni dovrebbe possedere due requisiti fondamentali: la necessaria semplicità nella sua costituzione e il buon rendimento nello sviluppo dei trofozoiti. Tali requisiti sono, in genere, in contrasto: spesso, infatti, impoverendo il terreno di sostanze nutritizie si ottiene lo sviluppo dell'ameba in misura, però, non adatta alla preparazione degli antigeni.

E' questo un punto, comunque, sul quale esiste un sufficiente accordo tra i ricercatori, giacchè, in genere, sono stati usati, a tutt'oggi, i due terreni classici di Boeck e Drbolhaw e di Cleveland e Collier. E' nostra opinione, suffragata dalla esperienza personale, che il primo terreno, specialmente nella sua formula modificata, pur dando un rendimento leggermente più modesto del secondo, si presta, però, meglio alla coltivazione delle amebe destinate alla preparazione degli antigeni. Ci sembra utile ricordare che alla coltura nei soliti tubi è consigliabile, in tal caso, sostituire quella in matracci di cc. 300. Dopo la coagulazione della fase solida sul fondo del matraccio, a mezzo di esposizione in una comune stufa a secco regolata a 85°C., si aggiungono cc. 150 circa della fase liquida. Sulla base della esperienza di Frye e Meleney e della nostra personale questo metodo permette di raccogliere, con risparmio di tempo e di materiale, una quantità notevole di trofozoiti, da destinare alla preparazione dell'antigene.

3) *L'associazione batterica più adatta.*

Sin dal primo momento in cui si riuscì a coltivare *E. histolytica* «in vitro» si lamentò la necessità di dover associare alla coltura una quantità più o meno notevole di specie batteriche, comunemente, intestinali. Se ciò rappresenta, indubbiamente, un grave inconveniente per lo studio dell'attività metabolica di *E. histolytica* e per le ricerche sull'attività amebicida dei farmaci, lo stesso non può dirsi per la preparazione degli antigeni.

A tal proposito troviamo nella letteratura numerose ricerche intese a stabilire l'influenza della flora batterica associata sulla sensibilità e specificità dell'antigene amebico.

Fulton saggiò un siero anti-*histolytica* con un antigene estratto dal *B.coli* associato alla coltura: si ebbe una positività con l'antigene amebico di 1 : 640 e con l'antigene preparato dal *B. coli* solo al titolo di 1 : 20. A sua volta il siero anti-*B. coli* diede positività al titolo di 1 : 80 con l'antigene omologo e 1 : 20 con l'antigene amebico.

Schubert con un ceppo di *E. histolytica* (103), coltivato in terreno di B. D. in associazione ad *organismo t*, preparò tre tipi di antigene: uno amebico, uno con l'*organismo t*, ed uno con il solo terreno di coltura. Dai risultati delle prove comparative eseguite su 490 sieri (vedi tabella 2) risultò evidente come nè l'antigene preparato con l'*organismo t* nè quello preparato con il semplice terreno colturale interferissero sulla sensibilità e specificità dell'antigene amebico.

Tabella 2 (da Schubert)

Antigene amebico 1:6	Antigene organismo t 1:6	Antigene terreno 1:4
128 ----	128 ----	128 ----
102 ± ---	96 ---- 11 ± ---	98 ---- 4 ± ---
63 + ---	57 ---- 6 ± ---	59 ---- 4 ± ---
63 ++ --	50 ---- 7 ± --- 6 + ---	60 ---- 3 ± ---
66 +++ -	58 ---- 3 ± --- 2 — --- 3 ++ --	63 ---- 3 ± ---
68 ++++	47 ---- 11 ± --- 2 + --- 3 ++ --	66 ---- 1 ± --- 1 +++ -
	1 +++ - 1 ++++	

A risultati identici pervenne Tsuchiya sperimentando con un batterio, non meglio specificato, associato allo stipite di *E. histolytica* usato; e Rees e Bozicevich e Reardon e Jones eseguendo le loro prove con l'*organismo t*.

Sulla base delle indagini su riferite ci sembra poter concludere che nè l'*organismo t* nè i colonbatteri associati ad *E. histolytica*, interferiscono sulla sensibilità e sulla specificità dell'antigene amebico. Lo stesso può dirsi del terreno colturale, rappresentato in genere dal Boeck e Drbohlav.

Se ai risultati conseguiti dai suddetti ricercatori aggiungiamo la possibilità di allontanare gran parte della flora batterica mediante una opportuna sedimentazione ed un accurato lavaggio del sedimento (ripetute centrifugazioni successive a 250-500 gpm) si può senz'altro affermare che l'associazione batterica costituisce un problema di secondaria importanza nella preparazione degli antigeni amebici. Sarà, comunque, consigliabile, quando sia possibile, scegliere ceppi coltivati con *organismo t* o con batteri dotati di scarso potere antigene, quale *Ps. aeruginosa;* tenendo, però, presente che non sorgono difficoltà neanche nel caso che il germe associato sia un colonbatterio.

4) *La tecnica da adottare per la preparazione dell'antigene.*

Dalla rapida rassegna sulle varie metodiche usate per la preparazione degli antigeni amebici abbiamo potuto trarre il convincimento che, nonostante le diverse tecniche adottate, spesso modificate da uno stesso Autore di lavoro in lavoro, si siano più frequentemente adoperati *estratti alcoolici* ed *estratti acquosi* di trofozoiti. Solo in epoca più recente si è iniziato lo studio dei criolisati e degli antigeni trattati mediante ultrasuoni, a quanto pare con risultati più soddisfacenti specie per i primi.

A dire il vero mancano nella letteratura prove comparative tra i vari antigeni

giacchè ogni Autore si è preoccupato di preparare un antigene, secondo il proprio criterio, e di cimentarlo con tecniche, non sempre uniformi, con sieri immuni e con sieri di ammalati.

Prove comparative sarebbero, invece, necessarie per scegliere la tecnica migliore di estrazione del materiale antigene grezzo dal corpo del protozoo, fermo restando il concetto, già espresso, che questo deve rappresentare solo il primo passo per arrivare alla separazione e alla purificazione delle eventuali frazioni antigeni, così come è stato realizzato per molte specie batteriche.

5) *La tecnica da adottare per la titolazione dell'antigene.*

E' questo un punto che, a tutt'oggi, non è stato messo nella sua giusta luce. La maggior parte degli AA. procedono, prima dell'estrazione dell'antigene, alla titolazione del numero dei trofozoiti contenuti nel sedimento, sottoposto a lavaggio, mediante conteggio in camera di Thomas o di Naubauer. In tal modo vengono allestite sospensioni a titoli oscillanti tra i 200.000 e i 6.000.000 di trofozoiti per cc. Qualche AA. esegue il conteggio sul sedimento prima di effettuare il lavaggio ripetuto dei trofozoiti, che si presentano, in tal caso, sotto forma di piccoli grumi, spesso ricoperti da masse di granuli di amido.

L'inconveniente maggiore di questo metodo di titolazione è però legato, a nostro avviso, alla variabilità nelle dimensioni dei trofozoiti e delle cisti di *E. histolytica.* Tralasciando le cisti che non vengono quasi mai usate per l'allestimento degli antigeni, è noto come la grandezza dei trofozoiti oscilli tra i 10-20 fino ai 40 micron; il diametro varia, infatti, non solo da ceppo a ceppo, ma è in rapporto, nelle colture, al terreno ed al momento in cui si effettua la raccolta, senza contare il fatto che in una stessa coltura potremo avere trofozoiti in diversi stadi di sviluppo e, di conseguenza di varie dimensioni.

E' sufficiente uno scarto nelle dimensioni di soli due o tre micron per dare antigeni di concentrazioni notevolmente differenti, pur restando fermo il numero dei trofozoiti per cc.. Con una sospensione di 100.000 elementi (per cc.) di 12 micron di diametro avremo, infatti, una superficie di trofozoiti pari a mmq. 11,3, mentre con la stessa composta, però, da trofozoiti di 14 micron di diametro tale superficie salirà a mmq. 15,5. Eseguendo un semplice rapporto percentuale il secondo antigene, a parità di numero di elementi contenuti, sarà più concentrato del 37%.

Sono stati tentati altri metodi di titolazione quale quello di essicare una determinata quantità di sospensione e di titolare il residuo secco per pesata o quello di titolare l'antigene cimentandolo con un siero sicuramente positivo.

Possiamo, però, dire che si tratta sempre di metodi molto empirici contro i quali è possibile sollevare fondate obiezioni. Non vi è, pertanto, dubbio, che la titolazione dell'antigene merita ancora attento studio, giacchè sarebbe auspicabile ottenere un *antigene standard*, con il quale poter condurre le ricerche in modo uniforme e comparabile.

II) Tecnica della r. d. c. per l'amebiasi.

Ci sembra superfluo insistere sulla necessità di uniformare la tecnica della reazione di deviazione del complemento, evitando, nel modo più assoluto, di adoperare metodiche varie che, spesso, non rispondono per sensibilità e precisione.

Da quanto abbiamo detto appare, infatti, evidente come per la r. d. c. nell'amebiasi occorra una metodica molto sensibile, atta a mettere in evidenza il modesto movimento anticorpale che si instaura nella forma intestinale, sia conclamata che asintomatica.

La r. d. c. secondo Kolmer e quella secondo Bozicevich sono, a nostro avviso, le metodiche consigliabili sia per la precisione del dosaggio e della titolazione dei vari

TABELLA N. 3

Risultati ottenuti dai vari AA. circa la positività della r. d. c. in relazione alla forma clinica di amebiasi.

AUTORI	Amebiasi intestinale	Amebiasi extraintestinale	Portatore asintomatico	Non amebiasici
CRAIG	24	—	—	201
CRAIG	65	1	—	561
CRAIG	82	—	—	607
SHERWOOD, HEATHMAN	12	—	—	123
CRAIG	167	1	—	841
TSUCHIYA	6	—	8	139
MAGATH, MELENEY	73	—	17	—
REES, BOZICEVICH, REARDON, JONES	20	4	—	77
BOE	—	—	5	116
RITA	61	2	—	—
TERRY, BOZICEVICH	6	9	—	—
HUSSEY, BROWN	124	17	—	116
FULTON, JOYNER, PRICE	83	—	—	182
BUCHMAN, KULLMAN, MARGONIS	64	—	—	550
ELSDON-DEW, MADDISON	—	29	—	—
KENNEY	29	—	—	274
MC DEARMAN	27	1	3	69
LIPPI, CAPOCACCIA, CAO-PINNA	187	22	—	2383
STEIGMANN, SHLAES, MINTZER, SCHAEFER	62	—	—	48
VILLARI, DIGILIO	20	—	—	76
HEINZ, BRAUNS, MAC NAB	8	11	—	43
WELLS	9	3	6	106
PETRINI	10	—	9	98
Totale dei casi esaminati	1139	100	48	6610
r.d.c. positive	681	90	10	245
Percentuale reazioni positive	**59,8%**	**90%**	**20,9%**	**3,7%**

elementi della reazione sia per la elevata sensibilità, dovuta sopratutto, alla fissazione del complemento a + 4°C. per 16-18 ore. Non vi è dubbio che la tecnica di KOLMER sia meno indaginosa di quella di BOZICEVICH e sarebbe, a parità di risultati, senz'altro preferibile. Mancano, però, a tutt'oggi prove comparative atte a darci un criterio sicuro e definitivo circa la tecnica migliore da adottare per precisione e facilità di esecuzione e per sensibilità e specificità dei risultati.

III) RILEVAZIONE DEI DATI CLINICI SUI SOGGETTI SOTTOPOSTI AD ESAME SIEROLOGICO.

E' fuori dubbio come nella valutazione della sensibilità della r. d. c. per l'amebiasi non si possa prescindere dall'esatta conoscenza della forma clinica del soggetto sottoposto ad esame sierologico, nonchè del periodo di malattia e dell'influenza che il trattamento terapeutico può eventualmente esercitare sul movimento anticorpale.

I vari AA., che si sono occupati dell'argomento, hanno raggruppato i soggetti, studiati sierologicamente, secondo criteri propri, non sempre facilmente comparabili. Quasi nessuno ha, poi, tenuto conto del giorno di malattia nel quale venne eseguito l'esame sierologico e del comportamento degli anticorpi in relazione al trattamento terapeutico e alla guarigione.

In queste condizioni un tentativo di schematizzazione dei dati clinici non è certamente facile; lo schema che noi presentiamo (vedi tabella 3), ricavato dai dati raccolti nella tabella 1, non è perfetto nè, alcune volte, scrupolosamente fedele, mancando spesso dati chiaramente interpretabili.

Abbiamo tentato un raggruppamento nei quattro gruppi fondamentali: *amebiasici intestinali*, *extraintestinali*, *portatori asintomatici* e *non amebiasici*, comprendendo con quest'ultima denominazione sia soggetti normali che affetti da varie malattie, comprese altre parassitosi non di natura amebica.

La elaborazione dei dati riferiti dai vari AA., anche se non sempre perfettamente fedele a causa della difficile interpretazione, dimostra, però, chiaramente come la rilevazione dei dati clinici abbia notevole importanza nella valutazione della sensibilità della r. d. c. nell'amebiasi. Appare, infatti, evidente come si abbia il 60% di positività nell'amebiasi intestinale, accertata con esame coprologico, mentre nella forma extra questa sale al 90% e nei portatori asintomatici è intorno al 21%.

La falsa positività del 3,7% circa non è un risultato completamente attendibile, giacchè abbiamo compreso sul gruppo dei non amebiasici, soggetti affetti da varie forme morbose, in genere non specificate. La eventuale presenza tra essi di affetti da lue, tubercolosi od altre malattie, nelle quali è frequente una «labilità serica» può infirmare il risultato ottenuto, portando le percentuali di aspecificità nei «soggetti normali» ancora a livelli più bassi.

E', a nostro avviso, consigliabile, data l'influenza esercitata dalla forma clinica di amebiasi sulla valutazione della sensibilità della r. d. c., come del resto delle altre reazioni sierologiche, che i ricercatori cerchino di uniformare quanto più è possibile la rilevazione dei dati clinici ed, a tal proposito, ci sembra utile proporre una scheda individuale, da compilare per ogni soggetto sottoposto ad esame sierologico, nella quale si tenga conto, oltre che della diagnosi clinica, del periodo di malattia nel quale sarà fatto l'esame e del trattamento terapeutico subito dal malato.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI.

Dai dati raccolti nella letteratura appare evidente come le prove sierologiche e, in particolar modo, la r. d. c. nell'amebiasi non siano ancora messe perfettamente a punto per una loro applicazione routinaria di laboratorio.

Mancano, ancora, molte acquisizioni di ordine dottrinario e sono necessari ulteriori perfezionamenti nella tecnica di preparazione degli antigeni e di esecuzione delle reazioni.

Scheda per la rilevazione relativa ai dati clinici e all'accertamento diagnostico di laboratorio nei soggetti sottoposti ad esame sierologico.

Dati anamnestici e clinici		Esami di laboratorio			
		9	10	11	12
1					
2					
3					
4					
5					
9					
7					
8					

In ogni quadro segnare i dati appresso indicati con le rispettive sigle o numeri:

1) Nazionalità e residenza; es.: Italia - Messina = I - Me.
2) Sesso ed età; es.: F - 28 oppure M - 35.
3) Professione.
4) Malattie pregresse.
5) Diagnosi: 1) forma acuta; 2) forma cronica; 3) sindromi varie intestinali; 4) forme extraintestinali; 5) altre forme; 6) sindromi sospette; 7) portatore asintomatico.
6) Data inizio malattia.
7) Data ultima riacutizzazione (se trattasi di forma cronica).
8) Cure: 1) emetina; 2) composti arseniali; 3) composti idrossi e clorossichinolinici; 4) aureomicina; 5) conessina; 6) altri antibiotici; 7) altre sostanze.
9) Specificare il tipo di esame praticato: 1) coprologico; 2) colturale; 3) sierologico.
10) Indicare la data di ogni esame.
11) Tecniche di esecuzione: *Coprologico*: a) es. fresco; b) col. vitale; c) col. ematossilina; d) flottazione; e) sedimentazione; *Colturale*: indicare il terreno usato: BD = Boeck e Drbohlav; CC = Cleveland e Collier etc.; *Sierologico*: a) r. d. c.; b) immobilizzazione; c) precipitazione; d) intradermoreazione; e) altre indagini sierologiche.
12) Indicare l'esito dell'esame con +++ o ———. Nel caso di es. coprologico indicare oltre la presenza di *E. histolytica* anche quella di altre forme protozoarie. Nel caso di indagini sierologiche indicare: tipo di antigene, ceppo da cui è stato estratto, terreno colturale in cui è stato coltivato; tecnica di fissazione del complemento adoperata.

Esistono, però, chiare premesse che fanno sperare per una non lontana risoluzione del problema, specie se gli sforzi dei ricercatori saranno tesi allo studio dei seguenti punti:

1) impiego di uno o più stipiti di *E. histolytica*, coltivati in un determinato terreno e con una determinata flora batterica associata, per la preparazione dell'antigene grezzo;

2) metodica di estrazione dell'antigene grezzo dal corpo delle amebe;

3) purificazione dell'antigene grezzo e studio delle varie frazioni antigeni;

4) metodica per la titolazione degli antigeni;

5) tecnica per la esecuzione della reazione;

6) rilevazione uniforme dei dati clinici sui soggetti sottoposti ad esame sierologico.

BIBLIOGRAFIA

Amaral A. D. F. (1944): Algumas contribuicoes do laboratorio para o estudo da amebiase. Tese de docencia, S. Paulo.

Boe J. (1945): Complement fixation antigen in *E. histolytica* infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *60*, 31.

Boeck W. C. and Drbohlav J. (1925): The cultivation of *Endamoeba histolytica*. *Am. J. Hyg.*, *5*, 371.

Bozicevich J. E. (1950): Discussion on amebiasis. *Am. J. Trop. Med.*, *30*, 154.

Bozicevich J. E. (1951): Immunologic diagnosis on parasitic diseases - Parasitic infections of man, Harry Most, New York, 37.

Bozicevich J. E. (1953): Sierological consideration relative the diagnosis of amoebiasis. *Medicina Colonial* (Madrid), *21*, 287.

Bozicevich J. E. (1955):Sierologic considerations relative to the diagnosis od amebiasis. *Amer. J. Gastroenterol*, *23*, 332.

Bozicevich J. E., Hayem H. M., Walston V. M. (1946): A method of conducting the 50% hemolisis end point complement fixation test for parasitic diseases. *U. S. Pub. Health Rep.*, *61*, 529.

Brown J. A. H., Whitby J. L. (1955): An immobilisation test for amoebiasis *J. Clin. Path.*, 8., 245.

Brug S. L. (1957): Een par nieuw ontdekte darmparasieten Geneesk. *Tijd. Nederland - Indie*, *57*, 570.

Brumpt E. (1925): Etude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n. sp. amibe à kystes quadrinuclees parasite de l'homme. *Bull. Acad. Med.*, *94*, 943.

Brumpt E. (1949): Precis de Parasitologie, 6 Ed., Masson e C. e Paris.

Buchman E., Kullman H. J., Margonis G. F. (1952): Evaluation of the complement fixation test in amebiasis. *Gastroenterology*, *21*, 391.

Bukantz S. C., Rein C. R., Kent J. F. (1946): Studies in complement fixation. II. Preservation of sheeps blood in citrate dextrose mixtures complement fixation test. *J. Lab. Clin Med.*, *31*, 394.

Buonomini G. (1954): Considerazioni e rilievi sulla condotta da seguire per una corretta diagnosi parassitologica di amebiasi. *Boll. Soc. Med. Chir. Pisa*, *22*, 189.

Buonomini G. (1955): Problemi immunitari nel campo dell'amebiasi. *Min. Med.* 7.

Buonomini G., Braccini L. (1952): Su la diagnosi parassitologica di amebiasi. Nota I. Due utili tecniche per la ricerca delle cisti nelle feci. *Riv. It. Igiene*, *12*, 256.

Buonomini G., Braccini L. (1954): Su la diagnosi parassitologica di amebiasi. Nota II. Proposta di uno schema di indagini ai fini di una corretta diagnosi. di *E. histolytica*. *Riv. It. Igiene*, *14*, 6.

Buonomini G., Ricciardi M. L. (1955): Sulla diagnosi parassitologica di amebiasi.

Nota III. L'importanza dell'esame colturale delle feci. *Acta Med. It. Mal. Inf. Parass.*, *10*, 13.

Buonomini e Ricciardi M. L. (1955): Osservazioni sulla coltivazione di *E.histolytica. Acta Med. Italica*, *1*, 67.

Buonomini G., De Blasi R., Ricciardi L. (1954): Studi sulla biologia di *Entamoeba histolytica*. Osservazioni e rilievi sulla coltivazione di stipiti autoctoni. *Riv. Parassitologia*, *15*, 285.

Buonomini G., De Blasi R., Barghini G., Ricciardi M. L. (1954): Osservazioni sulla coltivazione di *E. histolytica. Boll. Soc. Med. Chir. Pisa*, 22.

Burrows R. B. (1957): *Entamoeba Hartmanni. Amer. J. Hyg.*, *65*, 172.

Burrows R. B., Swerlow M. A., Frost J. H., Lepper C. K. (1954): Pathology on *Dientamoeba fragilis* infections of the appendix. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *3*, 1033.

Chanco P. P., Ramirez J., Medina C. E. (1956): Complement fixation test for amebiasis: some observations. *S. Thomas J. Med.*, *11*, 204.

Cole B. A., Kent J. F. (1953): Immobilisation of *Endamoeba histolytica* in vitro by antiserum produced in the rabbit. *Proc. Soc. Exper Biol Med.*, *83*, 811.

Colonello F. (1958): Sulla patogenicità primitiva o condizionata di *Entamoeba histolytica. Terapia*, *43*, 9.

Craig C. F. (1927): The presence of hemolytic, citolytic and complement-binding substances in extracts of *Entamoeba histolytica. Science*, *65*, 620.

Craig C. F. (1927): Observation upon the hemolytic, citolytic and complement-binding properties of extrac of *Entamoeba histolytica Am. J. Trop. Med.* 7, 225.

Craig C. F. (1928): Observation upon complement fixation in infections with *Entamoeba histolytica. Proc. Nat. Acad. Sc.*, *14*, 520.

Craig C. F. (1928a): Complement fixation in the diagnosis of infection with *Entamoeba histolytica. Amer. J. Trop. Med.*, *8*, 29.

Craig C. F. (1929): The technique and results of a complement fixation test for the diagnosis of infections with *Endamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med.*, *9*, 277.

Craig C. F. (1932): The pathology on amoebiasis in carrieres *Amer. J, Trop. Med.*, *12*, 285.

Craig C. F. (1932a): The amebiasis problems. *J.A.M.A.*, *98*, 1615.

Craig C. F. (1933): Further observation upon the complement fixation test in the diagnosis of Amoebiasis. An analysis of the result in the test in one thousend individuals. *J. Lab. Clin. Med.*, *18*, 837.

Craig C. F. (1937): Observation upon the pratical value of the complement fixation test in the diagnosis of amebiasis. *Am. J. Public Health*, *27*, 689.

Craig C. F. (1944): The etiology, diagnosis and treatment of Amebiasis. 332 pp. Williams & Wilkins, Baltimore.

Craig C. F. (1948): Laboratory diagnosis of protozoan diseases, Philadelphia.

Craig C. F. (1950): Amebiasis and the complement fixation test. *U. S. Armed Forces Med. J.*, *1*, 1337.

Craig C. F., Faust E. C. (1957): Clinical Parasitology, Lea & Febiger, Philadelphia.

Craig C. F., Kagy E. S. (1933): A study of complement fixation in experimental amoebiasis in dogs. *Amer. J. Hyg.*, *18*, 202.

Craig C. F., Scott L. C. (1935): Observations on antigenes for C. F., in amebiasis. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, *32*, 958.

Craig C. F., Swartzwelder J. C. (1938): Observations upon complement fixation test in monkeys infected with *Entamoeba histolytica. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *37*, 671.

D'Alessandro G., Burgio G. R. (1955): Fenomeni immunologici nelle infezioni protozoarie e loro applicazione diagnostica con speciale riguardo all'amebiasi, malaria, leishmaniosi, toxoplasmosi. *Gior. Mal. Inf. Paras.*, 7, 439.

De Carneri I. (1958): Studi su *Entamoeba moshkovskii*. II. *Entamoeba moshkovskii*

Tshalaia, 1941, come potenziale parassita: sua sopravvivenza nelle infezioni sperimentali intraepatiche nell'hamster e endeciecali del ratto albino. *Riv. Parassitol.*, *19*, 161.

De Carneri I. (1958a): Studi sulla virulenza di *Entamoeba histolytica*. I. Variazioni cicliche della virulenza di un ceppo di *Entamoeba histolytica* nell'infezione intestinale del ratto albino da parte di due ceppi di *E. histolytica* dopo lunghi periodi di apparente patogenicità. In corso di stampa su *Giorn. Mal. Inf.*

De Carneri I. (1958b): Studi sulla virulenza di *Entamoeba histolytica*. II. Riacquisto della virulenza verso il ratto albino da parte di due ceppi di *E. histolytica* dopo lunghi periodi di apparente apatogenicità. In corso di stampa su *Giorn. Mal. Inf.*

De Carneri I. (1958c): On the patogenicity and virulence of three laboratory strains of *Entamoeba histolytica*. *Atti 6º Congr. Intern. Med. Trop. Malaria*, Lisbona.

De Carneri I. (1958d): Recherches sur l'origine possibile de souches apathogènes de *Entamoeba histolytica*. In corso di stampa su *Bull. Soc. Path. Exot.*

Deschiens R., Poirier M. (1952): L'immunité dans les infestations parasitaires. *Ann. Inst. Pasteur*, *83*, 725.

Dolkart R. E., Halpern B., Cullen J. (1951): The diagnosis of amebiasis; the role of the complement fixation test and the incidence of the disease in the Chicago area. *J. Lab. Clin. Med.*, *38*, 804.

Dopter: citato da Elsdon-Dew e Madison (1952).

Elsdon-Dew R., Maddison S. E. (1952): Amoebic complement fixation reaction. *J. Trop. Med. Hyg.*, *55*, 208.

Faust E. C. (1943): Some modern conceptions of amoebiasis. *Trans. & Studies, Coll. Physicians, Phila. Ser. 4*, *2*, 101.

Faust E. C. (1952): Modern criteria for the laboratory diagnosis of amoebiasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, *1*, 140.

Faust E. C. (1954): Amebiasis. Charles C. Thomas, Springfeld, Illinois, 154 pp.

Faust E. C., Jung R. C. (1956): Protozoan and metazoan parasitoses of the intestinal tract. *Pediatric Clinics of North America*, Feb. 170.

Faust E. C., Hellbrunn I., Lewis R., Murray M. L. (1946): Differences in culturability infectivity and pathogenicity of human strains of *Endamoeba histolytica*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *33*, 270.

Faust E. C., Sawitz W., Tobie J., Odom V., Peres C. and Lincicome D. R. (1939): Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of Protozoa and Helminths in feces. *J. Parasitol.*, *25*, 244.

Faust E. C., D'Antoni J. S., Odom V., Miller M. J., Peres C., Sawitz W., Thomen L. F., Tobie J., Walker J. H. (1938): A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces *Am. J. Trop. Med.*, *18*, 169.

Fulton J. D., Joyner L. P., Price I.N.O. (1951): Studies on protozoa. Part IV. A complement fixation test for amoebiasis. *J. Trop. Med. Hyg.*, *54*, 23.

Goldman M. (1953): Cytochemical differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli* by means of fluorescent antibody. *Am. J. Hyg.*, *58*, 319.

Goldman M. (1954): Use of fluorescein-tagged antibody to identify cultures of *Endamoeba histolytica* and *Endamoeba coli*. *Amer. J. Hyg.*, *59*, 318.

Grasso (1933): *Policlinico Sez. Prat.*

Grasso e Sorge (1932): *Atti 38º Congr. Soc. It. Med. Int.*

Greff R. G. L. (1947): Agglutination of *Endamoeba histolytica*. *Amer. J. of Hyg.*, *27*, 131.

Hall B., Carruthers H. L. (1957): Observations on the value of the complement fixation test in the diagnosis and management of amoebiasis *Med. J. Australia*, *1*, 32.

HEATHMANN L. (1932): Studies of the antigenic properties of some free living and pathogenic amoebas. *Am. J. Hyg.*, *16*, 97.

HEINZ H. J., BRAUNS W., MAC NAB C. M. (1956): A new antigen for the amoebic complement fixation test. Interim report. *S. Afr. J. Med. Sci.*, *21*, 1.

HUSSEY K. L., BROWN H. W. (1950): The complement fixation test for hepatic amebiasis. *Am. J. Trop. Med.*, *30*, 147.

IZAR G. (1912): Diagnosi sierologica dell'amebiasi. *Boll. Acc. Gioenia Sc. Nat.*, Catania.

IZAR G. (1914): Studien ueber amoebenenteritis - Mitteilung: Ueber das Vorkommen spezifischer antikoerper in serum von amoebenrurkranken. *Arch. f. Schpp. Tropen - Hygiene*, *18*, 36.

JONES W. R. (1946): The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*: with a method for evaluating the anti - amoebic properties of new compounds. *Ann. Trop. Med.*, *40*, 130.

KENNEY M. (1952): Microkolmer complement fixation test for amebiasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, *1.*, 717.

KENT J. F., BUKANTZ S. C., REIN C. R. (1946): Studies in complement fixation test. I. Spectrophotometric titration of complement construction of graphs for direct determination of the 50% hemolytic units. *J. Immunology*, *53*, 37.

LEAL R. A. (1953): Intradermo - reaçao na amebiasi. Contribuçao para o seu estudo. Thesis, 1953, Sao Paulo.

LEAL R. A., AMARAL A. D. F. (1952): Agglutination of *Endamoeba moshkovskii* trophozoites (a free living organism) by human blood serum. *Arquives Facul. Hyg. Saude Pubbl. Università Sao Paulo*, *6*, 1/7.

LEWIN W. (1956): The amoebic complement fixation test (an evaluation). *Med. Prod.*, *2*, 6.

LIPPI M., CAPOCACCIA L., CAO - PINNA M. (1952): Ricerche sulla reazione di deviazione del complemento nell'amebiasi. *Arch. It. Sc. Med. Trop.*, *33*, 605.

MC DEARMAN S. C., DUNHAM W. B. (1952): Complement fixation tests as an ald in the differential diagnosis of extra-intestinal amebiasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, *1*, 182.

MC HARDY G. (1957): The moan precipitin test for amoebiasis. *Gastroenterology*, *30*, 353.

MAGATH T. B., MELENEY H. E. (1940): The complement fixation reaction for amebiasis: comparative test performed by two laboratories. *Am. J. Trop. Med.*, *20*, 211.

MARQUES DA CUNHA A., MUNIZ J. (1929): Consideraciones sobre *Entamoeba Hartmanni*. *Prenss Med. Argent.*, *15*, 1454.

MAYER M. M., EATON B. B., HEIDELBERGER M. (1946): Spectrophotometric standardization of complement for fixation test. *J. Immunolagy*, *53*, 31.

MELENEY H. E., FRYE W. W. (1937): Pratical value and significance of the complement fixation reaction in amebiasis. *Am. J. Public Health*, *28*, 505.

MENENDEZ P. E. (1932): Serological relationship of the *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Hyg.*, *15*, 785.

MOAN J. C. (1957): The serological diagnosis of amebiasis by means of the precipitin test. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, *6*, 499.

NEAL A. R. (1951): Some observation on the variation of virulence and response to chemoterapy of strains of *Entamoeba histolytica* in rats. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *44*, 439.

NEAL R. A. (1956): Strain variation on *Entamoeba histolytica*. III. The influence of the bacterial flora on virulence to rats, *Parasitology*, *46*, 183.

NEAL R. A. (1957): III. Virulence in *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *51*, 313.

NOLLER W. (1921): Uber einige wening bekhannte Darmprotozoen des menschen and ihre naschsten Vermandten. *Arch. Sahiffs. U. Tropenyg.*, *25*, 35.

OKAMOTO J. (1953): A comparison of strains of *Entamoeba histolytica* with special reference to their pathogenicity. II. On the rate infection and ulcer formation in albino rats wich were orally administered with cyst. *Kitasato Arch.*, *26*. 93.

PAULSON T., ANDREWS S. (1938): Complement fixation in amebiasis. A comparative valuation in clinical practice. *Arch. Inter. Med.*, *61*, 562.

PENSO G. (1935): Sulla individualità morfologica di *E. dispar*. *Arch. It. Sc. Med. Col.* *16*, 563.

PENSO G. (1941): La diagnosi coproscopica di amebiasi. *Gazz. Med. Ital.* *100*, 121.

PETRINI M. (1956): Diffusione della amebiasi e della lambliasi in Italia. Ricerche sul valore pratico della reazione della deviazione del complemento per la diagnosi di amebiasi. *Rassegna Medica*, *23*, 4.

PROWAZEK S. V. (1912): Wetiterer Beitrag zue Kenntnis der Enamoben. *VI. Arch. Protistenk*, *26*, 241.

REES C. W. (1950): The amebiasis panel (discussion). *Am. J. Trop. med.*, *30*, 165.

REES C. W., BOZICEVICH J., REARDON L. V., JONES F. (1942): A preliminare note in the complement fixation test for amebiasis with antigens prepared from *Entamoeba histolytica* grown with a single species of bacteria. *Amer. J. Trop. Med.*, *22*, 581.

RITA G. (1947): Contributo allo studio della sierodiagnosi della amebiasi. *Riv. di Parassitol.*, *8*, 113.

ROGOVA L. I. (1956): Pathogenicity of strains of dysentery amoeba recovered from healthy carrier. *Med. Parasit. Parasitic. Dis. Mosca*, *25*, 330.

SANDLER R. (1949): The value of the complement fixation test in the diagnosis of amoebiasis. *Harefuah, Tel. Aviv*, *37*, 88.

SCAFFIDI V. (1938): Ricerche parassitologiche sull'amebiasi a Catania. *Boll. Soc. Med. Chir.* Catania, *7*, 555.

SCAFFIDI V. (1939): Studi sulla fauna amebica catanese. *Folia Medica*, 18.

SCAFFIDI V. (1947): Parassitismo coprobiotico di entamoebe a cisti tetranucleate e patogenicità obbligata di *Entamoeba histolytica*. *Acta Med. It. Mal. Inf. Parass.*, 2.

SCAFFIDI V. (1947): I grandi parassitismi intestinali di entamoebe a cisti tetranucleate. *Giorn. Medicina Militare*, *94*, 5.

SCAFFIDI V., CASTORINA S. (1947): E' sufficiente lo studio dei caratteri nucleari per una sicura identificazione di specie di entamoeba? *Annali d'Igiene*, *57*, 333.

SCAFFIDI V., MOTTA S. (1941): Ricerca dei portatori sani di *Entamoeba disenteriae* nella Sicilia orientale. *Boll. Soc. Med. Chir.* Catania, *9*, 439.

SCAFFIDI V., POSITANO G. (1939): Dati statistici sulla frequenza dei protozoi intestinali a Catania. *Boll. Soc. Med. Chir.* Catania, *7*, 568.

SCALAS L. (1921): Contributo allo studio della deviazione del complemento nella dissenteria amebica. *Rif. Med.*, *37*, 103.

SCALAS L. (1923): L'intradermo - reazione nella dissenteria amebica. *Rif. Med.*, *39*, 967

SCHUBERT J. H., MAY M. C. (1952): A study of *organism t* antigen in the routine complement fixation test for amebiasis. *J. Lab. Clin. Med.*, *40*, 78.

SHERWOOD N. P., HEATHMAN L. (1932): Further studies on the antigenic properties of pathogenic and free living amebae. II. Complement fixation in amebic dysentery. *Am. J. Hyg.*, *16*, 124.

SHIRAOGAWA H. (1935): Immunologische Studien ueber die Dysenterieamoebe. *Fukuoka Acta Med.*, *28*, 113.

SPECTOR B. K. (1932): A comparative study of cultural and immunological methods of diagnosis infection with *Endamoeba histolytica*. *J. Prev. Med.*, *6*, 117.

STEIGMANN F., SHLAES W. H., MINTZER S., SCHAEFER G. (1953): An amebiasis complement fixation test in the diagnosis of intestinal amebiasis. *Gastroenterology*, *23*, 70.

STEINITZ H. (1949): The value of the complement fixation test in amebiasis. *Harefuah*, Jerusalem, *37*, 84.

STONE W. (1935): Bacteria free antigen for the complement fixation test in amebiasis. Preliminary report of a new method of preparation. *Am. J. Trop. Med.*, *15*, 685.

SWARTZWELDER J. C. (1937a): The cysts of *Endamoeba histolytica* formed in the intestine excyst before evacuation and cause internal. autoinfection. *Proc. Soc. Exp. Biol.* & Med., *36*, 266.

SWARTZWELDER J. C. (1937b): Experimental studies on *Endamoeba histolytica* in the dog. *Am. J. Hyg.*, *29*, 89.

SWARTZWELDER J. C., MC GILL H. S. JR. (1949): Intestinal amebiasis complicated by absces of the brain. Report of a case without hepatic or pulmonary involvement. *Rev. Keiba Trop. Med. y Parasitol 5*, 27.

SWARTZWELDER J. C., MULLER G. R. (1950): A comparison of the infection rate and gross pathology of amebic infection in normal and antigeninjected rats. *Amer. J. Trop. Med. 30*, 181.

TERRY L. L., BOZICEVICH J. (1948): The importance of the complement fixation test in amebic hepatitis and liver abscess. *South. Med. J.*, *41*, 691.

THOMPSON P. E., MC CARTHY D., REINERTSON J. W. (1954): Observations on the virulence of. *E. histolytica* during prolonged subcultivation. *Am. J. Hyg.*, *59*, 249.

TRIBONDEAU N., FISCHER T. (1916): *Ann. Inst. Pasteur*, *30*, 357.

TSUCHIYA H. (1934): Further studies on the cultivation of *Entamoeba histolytica* and a C. F. test for amoebiasis. *J. Lab. Clin. Med.*, *19*, 495.

VALENTINO L. (1956): La reazione di immobilizzazione nell'amebiasi. *Riv. Ist. Sier. Ital.*, *31*, 310.

VILLARI A., DIGILIO V. (1955): Le reazioni immunobiologiche nella diagnostica di laboratorio dell'amebiasi. *Acta Med. It. Mal. Infett.*, *10*, 119.

WEISS E., ARNOLD L. (1934): The specificity of the complement fixation test for amebiasis. *Am. J. Digest. Dis.*, *1*, 548.

WEISS E., ARNOLD L. (1934): Complement fixation test for amebiasis preliminary report. *Am. J. Digest. Dis. 1*, 231.

WEISS E., ARNOLD L. (1937): Complement fixation test for Amebiasis with increased antibody content. *Am. J. Dig. Nutr. 4*, 283.

WELLS R. (1956): The amoebic complement fixation test. *Med. J. Malaya*, *11*, 93.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 4. - ottobre 1958

NOTE E OSSERVAZIONI

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELL'AZIONE FARMACOLOGICA DEL VELENO DI *LATRODECTUS TREDECIMGUTTATUS* ROSSI II. AZIONE SULLA MUSCOLATURA BRONCHIALE

In precedenti lavori sono state studiate la natura del veleno di *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi (6) e l'azione sugli organi *in vitro* (5); la presente esperienza è intesa a chiarire gli effetti di questo veleno sulla muscolatura bronchiale.

Nella sindrome prodotta dal morso di *L. tredecimguttatus* e delle altre specie di *Latrodectus* (latrodectismo), si notano spesso sintomi a carico della respirazione: il paziente durante le prime ore dell'intossicazione è frequentemente tachipneico con respirazione superficiale, talvolta accompagnata da stridore; il successivo ritorno alla norma avviene nel rimanente periodo di degenza (18). Spesso il paziente è dispnoico e accusa sensazione di oppressione precordiale (1, 3, 4, 9, 11, 13, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26). Il Gennari (14) osserva che questi sintomi sono dovuti alla immobilizzazione del torace per lo spasmo dei muscoli inspiratori e probabilmente a broncospasmo.

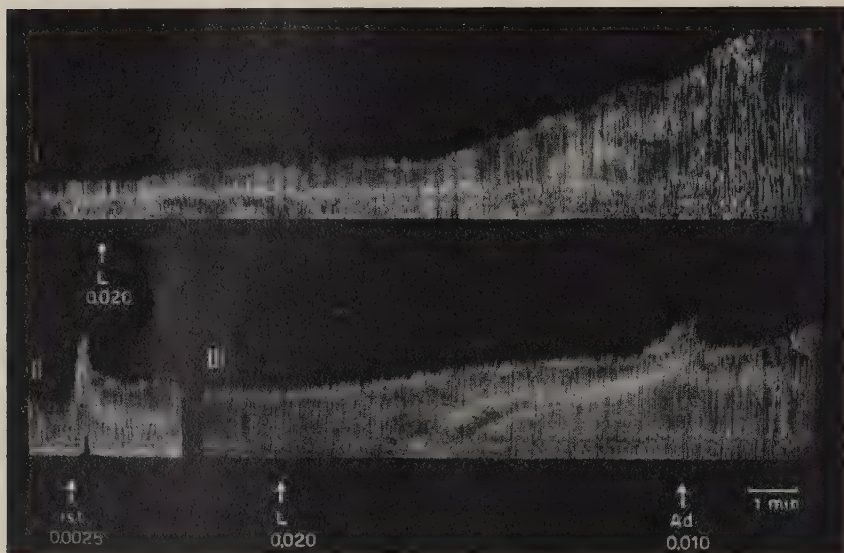
Secondo Troise (27) l'inoculazione di questo veleno nella cavia provoca inspirazione profonda con spasmo diaframmatico; in seguito la inspirazione diviene difficile e l'animale muore in asfissia; all'autopsia il polmone è disteso e non si collassa alla apertura del torace. Anche nel cane il veleno provoca un rallentamento della respirazione. Il coniglio e la cavia intossicate (15) mostrano dopo un periodo di forte dispnea, una respirazione irregolare intercisa a scatti. Nel coniglio, inoculato endovena con veleno, si osserva un aumento degli atti respiratori (7). Nel ratto, (8) la somministrazione di veleno conduce ad una respirazione molto laboriosa: l'animale inspira con difficoltà senza riuscire a riempire i polmoni di aria; tale dispnea continua fino allo stato terminale dell'animale (il reperto anatomo patologico rileva che i polmoni si collassano all'apertura del torace).

Le alterazioni funzionali dei bronchi sono state studiate sperimentalmente da Sampayo (23) il quale dalle registrazioni pneumografiche deduce che il veleno provoca nella cavia costrizione bronchiale e nel cane alterazioni respiratorie dovute in gran parte a contrazioni muscolari del torace e dell'addome. Lo stesso A. riporta che un cane trattato con forti dosi di veleno, 4 minuti dopo l'inoculazione, presentò respirazione irregolare con notevole aumento dei movimenti respiratori, alternata con periodi di apnea contemporaneamente all'aumento massimo della pressione arteriosa; l'inoculazione di siero anti-*Latrodectus* portò alla scomparsa di tutti questi sintomi. Un altro cane trattato con siero, e dopo circa 20 minuti con dosi elevate di veleno non mostrò alcuna alterazione del pneumogramma.

Maretic e Stanic (18) osservano che la bronchite riscontrata in alcuni casi di latrodectismo umano è senz'altro da imputare ad alterazioni funzionali dei bronchi. Come probabile conseguenza di queste alterazioni si nota spesso un edema polmonare, confermato dai reperti anatomo-patologici nell'uomo (1), e nella cavia (2, 27).

Per indagare ulteriormente sull'azione del veleno di *L. tredecimguttatus* sulla muscolatura bronchiale è stato impiegato il seguente metodo.

Tecnica: Gli esperimenti sono stati condotti su sette cavie del peso medio di Kg 0,600. Gli animali in anestesia barbiturica (35 mg/Kg di nembutal per via intraperi-



Azione del veleno di *Latrodectus tredecimguttatus* sul tono dei muscoli bronchiali.

I° — Cavia maschio 500 g — anestesia barbiturica

L = mg/Kg di soluzione di ghiandole secche alla dose indicata endovena.

II° — Cavia maschio 600 g — anestesia barbiturica.

Ist = mg/Kg di istamina alla dose indicata endovena.

III° — Cavia maschio 550 g — anestesia barbiturica.

L = mg/Kg di soluzione di ghiandole secche alla dose indicata, endovena.

Ad = mg/Kg di adrenalina alla dose indicata, endovena.

toneale) e dopo intubazione tracheale venivano sottoposti a respirazione artificiale con pressione positiva costante con pompa Palmer.

Per evitare i disturbi derivati da movimenti respiratori spontanei gli animali venivano curarizzati (10 mg/Kg di Flaxedil in un ramo della giugulare esterna preparata con una cannula).

L'omogenato di ghiandole di *L. tredecimguttatus* veniva somministrato per via endovenosa.

Le risposte della muscolatura bronchiale sono state registrate col metodo di Kon-

ZETT e ROESLLER (17) basato sulle misure differenziali della quantità di aria che ad ogni insufflazione riesce a penetrare nei polmoni. Uno stato di broncospasmo porta ad una riduzione della quantità di aria che può essere introdotta nei polmoni, il che si riflette in un aumento dell'altezza del tracciato registrato.

Risultati: Il grafico della figura mostra chiaramente l'azione broncocostrittrice del veleno, che si instaura progressivamente a partire da circa un minuto dalla somministrazione e che raggiunge il suo massimo entro 12-15 minuti.

Le dosi efficaci sono di 0,01 - 0,03 mg/Kg. i. v.

L'effetto è irreversibile ed è antagonizzato, solo per un breve periodo di tempo, dalla somministrazione di 0,01 - 0,015 mg/Kg. di adrenalina. L'atropina, la scopolamina, la benezedrina, la pirilamina (Neoantergan) ed il siero anti-*Latrodectus*, preparato dall'Istituto Superiore di Sanità, anche somministrati a dose elevate per via endovenosa, non mostrano nessuna azione antagonista nei confronti di questo broncospasmo entro le due o tre ore durante le quali si sono protratte le esperienze.

Per le sue caratteristiche (insorgenza lenta e irreversibilità) l'effetto di questo veleno è difficilmente confrontabile con altri tipi di broncospasmo noti. (Dalla figura appare chiaro quanto la sua azione differisca da quella dell'istamina).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

L'azione broncocostrittrice del veleno di *L. tredecimguttatus* rilevata da queste esperienze, conferma i dati sperimentali di SAMPAYO (23) ottenuti sulla cavia e sul cane, sebbene con la tecnica adottata da questo A. non si possono escludere le alterazioni respiratorie dovute alle contrazioni muscolari del torace e dell'addome. In seguito alla presente ricerca, invece, avendo impiegato cavie curarizzate, si è in grado di ritenere che le alterazioni registrate dal grafico siano dovute esclusivamente alla costrizione bronchiale. E' degno di nota il fatto che il siero antitossico non ha azione antagonista sul broncospasmo, e ciò farebbe supporre che l'azione tossica del veleno sia dissociata dall'azione broncospastica.

Da questi risultati si può quindi concludere che la difficoltà nella respirazione presente nel latrodectismo, è in gran parte dovuta ad un broncospasmo.

G. P. CANTORE e S. BETTINI
Istituto Superiore di Sanità

BIBLIOGRAFIA

1) BAERG W. J. (1922): The effects of the bite of *Latrodectus mactans*. *J. Parasit.* *9*, 162 - 169.

2) BETTINI S., RAVAIOLI L. e CANTORE G. P. (1954): Nota preliminare sulla preparazione di un siero immune specifico verso il veleno di *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi. *Rend. Ist. Sup. San.* *17*, 192 - 199.

3) BLAIR A. W. (1934): Spider Poisoning: Experimental study of the effects of the bite of the female *Latrodectus mactans* in man. *Arch. Intern. Med.* *54*, 831 - 843.

4) BOGEN E.: (1926) Arachnidism, spider poisoning. *Arch. Intern. Med.* *38*, 623-649.

5) CANTORE G. P. (1958): Contributo allo studio dell'azione farmacologica del veleno di *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi, *Riv. Parass.* *19*, 158 - 160.

6) CANTORE G. P. e BETTINI S. (1958): Contributo allo studio del veleno di *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi. *Rend. Ist. Sup. San.* *21*, 794 - 805.

7) Castelli A. (1913): Sulla tossicità delle punture del *Latrodectus tredecimguttatus* esistente in Sardegna. *Arch. farm. spec. sc. aff. 16*, 183 - 192.

8) D'Amour F. E., Becker F. E., Van Riper W. (1936): The black widow spider. *Quart. Rev. Biol. 2*, 123 - 160.

9) De Asis C. (1934): « Red Back » spider bite and magnesium sulphate treatment. A clinical study of « four cases. *Am. J. Trop. Med. 14*, 33-44.

10) Finlayson M. H. (1936): « Knoppie - Spider » bite. *South Afric. Med. J. 10*, 43 - 45.

11) Frank L. (1942): The black widow spider bite syndrome. *Mil. Surgeon, 91*, 329 - 336.

12) Gajardo - Tobar R. (1951): La anatomía patológica del latrodectismo. *Bol. Inform. Paras. Chil. 6*, 20 - 21.

13) Gaud I. et Delesalle D. (1949): Aranéisme dû aux morsures de *Latrodectus* au Maroc. *Bul.. [illegible] t. Hyg. Maroc 9*, 232 - 237.

14) Gennari G. (1952): Sindrome addominale da morso di aracnide simulante l'ulcera gastrica o duodenale perforata. *Il Policlinico* (Sez. Prat.) *59*, 1 - 9.

15) Giusti V. G. (1926): Il ragno rosso o falange volterrana e la sua velenosità. *Rass. Volterr. 2*, 1 - 23.

16) Kobert R. (1901): Beitrage zur Kenntnis der Giftspinnen. F. Enke, Stuttgart.

17) Konzett R. e Roesller R. (1940): Versuchsanordung zu untersuchugen auf der Bronchiolmuchulatur. *Arch. exper. Path. Pharmak. 195*, 71-74.

18) Maretic Z. e Stanic M. (1954): The health problem of arachnidism. *Bull. Org. Mond. Santé 2*, 1007 - 1022.

19) Paganelli A. (1937): L'araneismo nella provincia di Roma. *Gazz. Intern. Med. Chir. 47*, 782 - 786.

20) Pantilla F. C. e Mabalay E. (1935): *Latrodectus agoyangyang*. Preliminary notes on the entomological, clinical and experimental studies. *Monthly Bull. Bur.* of *Health Manila 15*, 187 - 197.

21) Prince Q. E. (1956): Arachnidism in children. *J. Pediatrics 49*, 101 - 108.

23) Sampayo R. R. L. (1944): Pharmacological action of the venom of *Latrodectus mactans* and other *Latrodectus* spiders. *J. Pharm. Exp. Ther. 80*, 309 - 322.

24) Schenone H. F. (1953): Mordeduras de arañas. *Bol. Inform. Paras. Chil. 8*, 35 - 37.

25) Shapiro H. A., Sapeike N. e Finlayson M. H. (1939): Pharmacological action of the venom of *Latrodectus indistinctus. S. African J. Med. Sci. 4*, 10 - 17.

26) Taylor F. H. e Murray R. E. (1946): Spiders, ticks and mites including the species harmful to man in Australia and New Guinea. *Commonwealth of Australia, Service Publ., n. 6.*

27) Troise E. (1928): Action pharmacodynamique du venin de *Latrodectus mactans. C. R. Soc. Biol. 99*, 1431 - 1433.

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELL'AZIONE FARMACOLOGICA DEL VELENO DI *LATRODECTUS TREDECIMGUTTATUS* ROSSI III. AZIONE SUL RITMO CARDIACO E SUL CIRCOLO ARTERIOSO

In precedenti lavori è stata studiata la natura del veleno di *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi (12) e l'azione farmacologica sugli organi isolati *in vitro* (10) e sulla muscolatura bronchiale(11).

In questa nota sono riportati i risultati di alcune esperienze sull'azione del veleno sul ritmo cardiaco e sul circolo arterioso, e poichè gli effetti farmacologici del veleno delle varie specie di *Latrodectus* sono simili tra loro, viene citata, come nei precedenti lavori, oltre alla letteratura riguardante il veleno di *L. tredecimguttatus*, anche quella che concerne le altre specie di *Latrodectus* senza far distinzione fra loro.

I reperti clinici riportati dai vari AA. danno dati contrastanti circa le alterazioni del ritmo cardiaco nel latrodectismo; infatti, per alcuni si reperta semplicemente tachicardia (32, 31, 22, 4, 21, 3, 2); Le Gac (24) riferisce, in un caso da lui descritto, che il polso poco dopo il morso era piccolo, «incomptable», mentre la temperatura restava normale (37°2); secondo altri AA. invece, nel latrodectismo si reperta soltanto bradicardia (7, 20, 13, 16). Pampiglione (27), su 4 casi descritti, ha notato che in uno non vi erano alterazioni del polso, in due casi vi era bradicardia e in un quarto il polso durante le prime ore dell'intossicazione era di 132 pulsazioni per minuto (p. p. m.) con aritmie extra-sistoliche. Bogen (8) osserva che il polso è generalmente ritardato in rapporto con la temperatura, al disotto di 72 p. p. m. nella metà dei pazienti al momento dell'ammissione in ospedale, al disotto di 66 p. p. m. nella maggioranza dei casi durante i primi giorni di degenza. Gajardo Tobar (19) riporta che prima si osserva tachicardia e poi bradicardia, ed a volte aritmia. Frank (17) riferisce di aver notato bradicardia nel 30% dei casi e frequenza normale o leggermente aumentata nel rimanente di essi. Baerg (1) si fece mordere da *L. mactans* e registrò un polso che oscillò per 12 giorni fra 60 e 70 p. p. m.; mentre Blair (6) nelle stesse circostanze presentò all'inizio un polso leggermente rallentato che andò progressivamente aumentando di frequenza fino a raggiungere, verso la terza ora dal morso, le 120 p. p. m. in coincidenza di uno stato di collasso con pressione arteriosa di 80 mm Hg. Secondo Bettini e Coll. (5) un solo caso dei 5 descritti ha presentato tachicardia. Paganelli (27) che riferisce su 9 casi di latrodectismo, riporta che il polso di questi pazienti, «raro ed ipoteso in taluni casi, può essere anche un po' frequente e piccolo: normale in altri: mai iperteso». Talvolta è stato notato che il polso è «intermittente» (34, 38). Kobert (25), su 22 casi studiati, riporta una frequenza al polso che oscilla fra i vari casi nei limiti normali, cioè fra 60 e 78 p. p. m. Molti autori, inoltre, omettono di riportare la frequenza al polso nei casi da loro descritti, per cui essi lasciano intendere che il ritmo cardiaco sia normale.

L'aumento dela pressione arteriosa è sintomo pressochè costante. Di solito l'aumento al disopra della norma è di 20-40 mm Hg (7, 8, 38, 20, 2), o anche maggiore (3, 34), e talvolta raggiunge i 100 mm Hg (19, 26); secondo Maretic e Stanic (26) l'ipertensione è di tipo convergente, nel senso che nella prima fase dell'intossicazione si può riscontrare sia ipertensione, sia uno stato di shock ipotensivo. Il ritorno alla norma avviene tuttavia rapidamente: secondo Bogen (8) entro le 24 ore nella maggior parte dei casi, e secondo Schenone e Coll. (34) tra le 2 ore e i 5 giorni successivi al

morso. Blair (6), dopo essersi fatto mordere dal ragno, registrò dopo 1 ora una pressione di 106/78 mm Hg e 62 p. p. m. di polso, dopo 3 ore 80/50 mm Hg e 120 p. p. m. e dopo 9 ore 154/92 mm Hg e 78 p.p.m. Constant e Geuère (21) riferiscono che in un caso (di 3 descritti) si verificò un collasso circolatorio, con pressione arteriosa decrescente, che portò a morte il paziente.

Reperti ascoltatori e tracciati electrocardiografici (ECG) mostrano alterazioni transitorie del cuore soltanto in pochi casi, durante le prime ore dell'intossicazione. Schenone e Coll. (34) segnalano che soltanto in 2 casi l'esame obiettivo del cuore ha messo in evidenza un soffio sistolico alla punta ed al focolaio della polmonare, ed un terzo tono cardiaco intermittente: inoltre gli ECG eseguiti su 6 casi mostrano in 5 di essi alterazioni, sempre transitorie, del tratto S-T e dell'onda T. Maretic e Stanic (26) solo in uno degli ECG eseguiti su 7 pazienti repertano alterazioni del segmento S-T con un prolungamento dell'intervallo Q-T, alterazioni che secondo gli AA. possono essere attribuite a spostamenti dei livelli del calcio e del potassio nel plasma.

Gli studi sperimentali sul veleno di *Latrodectus* di Shapiro (34) su gatti anestetizzati e su gatti decapitati, dimostrano che il veleno inoculato provoca un aumento della pressione arteriosa. Lo stesso fatto fu notato, in cani anestetizzati, da Troise (39) il quale però osservò che questo effetto non si manifestava costantemente nei cani inoculati endovena con vari campioni più o meno tossici di veleno, per cui Troise deduce che l'effetto ipertensivo non è dovuto alla neurotossina del veleno, ma ad un altro costituente, ben diverso dal fattore tossico. Altre esperienze compiute da Sampayo (32), dimostrano che l'inoculazione del veleno in gatti, cani e ratti, provoca in tutti un innalzamento della pressione, ma tale fenomeno non risulta uniforme con i vari campioni di veleno diversi per tossicità, per cui anche questo A. confermerebbe le conclusioni di Troise (39), ritenendo l'ipertensione provocata da un fattore diverso da quello neurotossico dello stesso veleno. Lo stesso A. afferma che l'aumento della pressione arteriosa è dovuta a vasocostrizione generalizzata, non viene modificato da atropina, è molto rinforzato da cocaina e diminuito o abolito da Forneau 933; tale aumento è presente dopo la decapitazione e l'estirpazione del seno carotideo e la resezione di ambedue i vaghi. L'azione vasocostrittrice diretta del veleno, confermata anche dalle esperienze di Suarez e Coll. (36) su cani decapitati, non viene modificata dalla somministrazione di ganglioplegici (9). Cicardo (14) studiando l'effetto del veleno di *L. mactans* inoculato endovena in 28 cani immobilizzati con tubocurarina, ha notato un aumento della pressione arteriosa, che è iniziata dopo una latenza da 30" fino a 3', ed è giunta ad un massimo entro 15-60 minuti e che in seguito è scomparsa. (La regitina e l'idergina hanno fatto discendere la pressione aumentata). Cicardo ha inoltre osservato che l'ipertensione si verifica anche negli animali decerebrati, e che la surrenalectomia non elimina l'ipertensione ma la diminuisce. Sembra inoltre, secondo l'autore, che il veleno ecciti i centri vasomotori.

Sampayo (32) osserva, infine, che l'ECG in cani inoculati con veleno, mostra una riduzione del voltaggio di R, un aumento del segmento S-T e spostamento dell'onda T che cambia da difasica a positiva in II e III derivazione; nella cavia inoculata si osserva sempre un cambiamento di direzione dell'onda T; tali alterazioni non si notano, sia nel cane che nella cavia, quando gli animali vengono preventivamente trattati con siero anti-*Latrodectus*.

I) *Azione sul ritmo cardiaco.*

Tecnica: Coniglio in anestesia uretanica (uretano etilico al 25%, 1,5 g/Kg intraperitoneale), in pronazione ed estensione degli arti, a trachea intubata per facilitare la respirazione spontanea e poter eventualmente applicare la respirazione artificiale.

La registrazione elettrocardiografica è stata presa in II derivazione alla velocità di 4 cm/sec. Sono state usate dosi diverse di veleno, da 0,05 a 0,3 mg/Kg per via intravenosa (vena marginale dell'orecchio).

Risultati: Dall'esame dei tracciati raccolti nelle esperienze su 4 animali, si è osservato che in queste condizioni sperimentali con 0,05 mg/Kg di omogenato di ghiandole si ha un fugace rallentamento de ritmo cardiaco (17% dopo circa 1'30" dall'iniezione) con rapido ritorno alla norma dopo 3-4 minuti; proseguendo l'esperienza sullo stesso animale con dosi superiori (0,1 mg/Kg), si nota un rallentamento del 50% dopo 7-10 minuti dalla iniezione, con lento ritorno alla norma in 25-30 minuti. Ulteriori somministrazioni del veleno anche a dosi elevate (0,5 mg/Kg) non determinano più modificazioni evidenti del ritmo cardiaco.

La forma del tracciato non presenta modificazioni significative.

II) *Azione sul circolo arterioso.*

Tecnica: In 5 conigli del peso medio di Kg 2,300 in anestesia uretanica (uretano etilico in soluzione al 25%, 1,5 g/Kg di cui 0,75 g intra peritoneale e 0,75 g sottocute), la pressione arteriosa è stata registrata con manometro a membrana (Palmer) direttamente connesso con una cannula fissata nell'arteria carotide comune. In tutti gli animali è stata intubata la trachea per facilitare la respirazione spontanea. Le iniezioni sono state praticate per via endovenosa (cannula introdotta in un ramo della giugulare esterna). Gli animali venivano regolarmente eparinizzati (1 mg/Kg intravena) per evitare la coagulazione del sangue nel sistema di registrazione della pressione arteriosa.

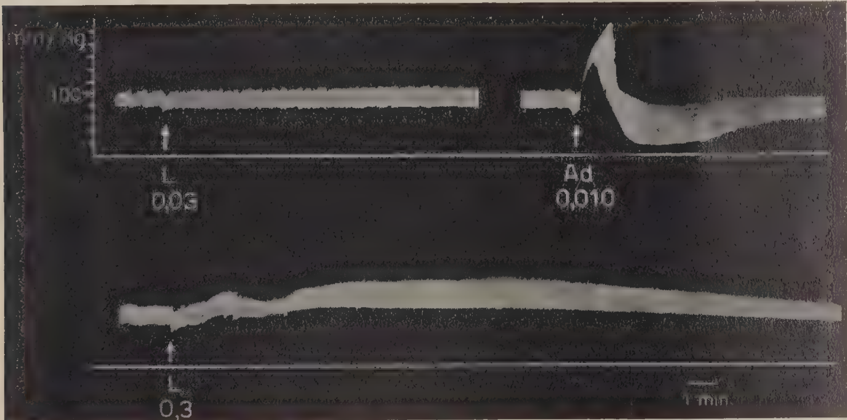


FIG. 1 — Azione di piccole e forti dosi di veleno di *Latrodectus tredecimguttatus* sulla pressione arteriosa di coniglio maschio di 2 Kg — Anestesia con uretano etilico 1,5 g/Kg — Pressione arteriosa della carotide registrata con manometro a membrana.

L. : mg/Kg di omogenato di ghiandole secche intra-vena alle dosi indicate.

Ad. : mg/Kg di adrenalina alla dose indicata.

Risultati: Come si nota dalla fig. 1, 0,025-0,030 mg/Kg di veleno non determinano evidenti modificazioni della pressione arteriosa. Si osserva spesso nell'emodinamogramma un aumento di ampiezza del tracciato riferibile ad un rallentamento del ritmo cardiaco, documentato anche dall'esame elettrocardiografico. Questa azione è ancora più evidente a dosi superiori (0,1 - 0,3 mg/Kg di veleno intravena) che provocano anche un progressivo aumento (35-40 mm di Hg) della pressione arteriosa che rag-

giunge il suo massimo in 5' - 6' e ritorna lentamente ai valori iniziali o anche al disotto di questi in 25' - 30'. Soltanto in alcune esperienze si è notato in seguito ad una prima forte somministrazione di veleno un più rapido ma fugace innalzamento della pressione.

La reazione ipertensiva all'adrenalina (0,01 mg/Kg intravena) registrata sia prima che dopo l'inoculazione di veleno, non è mai stata modificata da queste dosi.

Discussione e conclusioni

La risposta bradicardica alla somministrazione endovenosa del veleno di *Latrodectus tredecimguttatus*, come risulta dalla registrazione E. C. G. e dal primo tratto dell'emodinamogramma della fig. 1, compare già a dosi modeste e prive praticamente di effetti ipertensivi arteriosi: questo sta ad indicare che il rallentamento del ritmo cardiaco non può essere considerato un fenomeno riflesso secondario all'aumento della pressione arteriosa.

Ammessa, in base alle numerose esperienze condotte su animali decapitati, una azione diretta del veleno sul sistema cardiocircolatorio, notiamo che un aspetto caratteristico dell'azione cardiocircolatoria è dato dai fenomeni di tachifilassi (*), ossia dalla progressiva riduzione dell'attività bradicardizzante e ipertensiva che si osserva quando dosi uguali ed anche crescenti del veleno vengano ripetutamente somministrate nello stesso animale. E' evidente che questo particolare aspetto dell'attività cardiocircolatoria del veleno rende poco attendibile un dosaggio biologico che si basi sulle risposte bradicardiche o su quelle ipertensive arteriose dell'animale anestetizzato; per cui se le esperienze di Troise (39) e di Sampayo (32) sono state condotte con somministrazioni ripetute di veleno sullo stesso animale, è difficile che si possa arrivare a conclusioni sulla dissociabilità del fattore ipertensivo da quello tossico del veleno. Una risposta a questo problema potrà aversi sperimentando, come è nel nostro programma, sulle frazioni proteiche del veleno.

Già in una precedente pubblicazione (10) si era accennato alle analogie che il veleno di *L. tredecimguttatus* presenta con sostanze di tipo polipeptidico nei riguardi della azione contratturante sull'intestino isolato di coniglio; i dati qui riportati illustrano un altro aspetto di questa analogia: è infatti frequente il riscontro di fenomeni tachifilattici nell'azione emodinamica di molti polipeptidi (18). A questa ipotesi sono pure favorevoli le osservazioni di Calvo e Coll. (9) dalle quali risulta che i farmaci simpaticolitici non modificano l'azione vasocostrittrice periferica del veleno: infatti l'azione ipertensiva arteriosa di varie sostanze di tipo polipeptidico (*ipertensina*) non viene modificata dai farmaci adrenosimpaticolitici (28).

Dal punto di vista della patologia umana le osservazioni sull'azione bradicardizzante del veleno confermano quanto già osservato sull'uomo da Bogen (8), e, parzialmente, da Frank (17). Tuttavia, non si può fare facilmente un parallelo fra casi clinici ed esperienze sugli animali in quanto le osservazioni sono state compiute a tempi diversi dall'inizio della sindrome, ed in ogni caso, per ovvie ragioni, mai immediatamente dopo il morso; mentre gli animali da esperimento sono stati seguiti sin dal momento dell'inoculazione del veleno; inoltre l'inoculazione negli animali è stata eseguita per via endovenosa, il che non può essere paragonato al morso del ragno nell'uomo.

Per quanto riguarda gli effetti ipertensivi arteriosi, i risultati di queste esperienze convalidano le osservazioni dei vari AA., come già riportato, sugli animali da esperimento (gatto, cane, ratto) nei quali si ha sempre ipertensione in seguito alla inoculazione di veleno. Ciò è vero, ma non sempre, nella casistica umana; difatti, mentre la maggior parte dei casi ha mostrato una più o meno elevata ipertensione, si è avuto

(*) Come già osservato sul cane da Sampayo (32 bis).

un certo numero di casi in cui l'ipotensione è stata presente sia come fenomeno transitorio sia come fenomeno caratterizzante la gravità del caso. Può darsi che l'abbassamento della pressione, come nel caso di BLAIR (6) a 3 ore dopo il morso, sia un episodio transitorio che vada ricollegato alla modesta ipotensione osservata nel coniglio a 25-30' dall'inoculazione endovenosa di veleno.

In ogni caso, lo stato ipotensivo che si può verificare nel latrodectismo non va considerato solo come peculiare caratteristica di questa sindrome, ma è da tenersi sempre presente, quando si abbia in cura tali pazienti, poichè non è improbabile che si verifichi in tali circostanze un collasso circolatorio a volte imponente che può condurre anche a morte il paziente (15).

G. P. CANTORE e S. BETTINI
Istituto Superiore di Sanità

BIBLIOGRAFIA

1) BAERG W. J. (1922). The effects of the bite of *Latrodectus mactans J. Parasit. 9*, 162 - 169.

2) BELL J. E. e BOONE J. A. (1945). Neostigmine methylsulfate an apparent specific for arachnidism (black widow spider bite). J. A. M. A. *129*, 1016 - 1017.

3) BETTINI S. e CALCARA S. (1956). Terapia del morso di *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi. Sul primo caso di latrodectismo trattato con siero immune in Italia. *Riv. Parass. 17*, 186 - 189.

4) BETTINI S. e CANTORE G. (1953): La terapia del morso di *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi. Nota I - Su un caso di latrodectismo trattato con gluconato di calcio endovena. *Arch. It. Sc Med. Trop. Parass. 34*, 136 - 144.

5) BETTINI S., ANTONINI E. e CANTORE G. P. (1953). La terapia del morso di *Latrodectus tredicimguttatus* Rossi. Nota II - Cinque nuovi casi di latrodectismo trattati con gluconato di calcio endovena. *Arch. It. Med. Trop. Parass. 34*, 579 - 587.

6) BLAIR A. W. (1934). Spider poisoning: Experimental study of the effects of the bite of the female *Latrodectus mactans* in man. *Arch. Intern Med. 54*, 831 - 843.

7) BOGEN E. (1932). Poisonous spider bites: Newer developments in our knowledge of arachnidism. *Ann. Intern. Med. 6*, 375 - 388.

8) BOGEN E. (1926). Arachnidism. Spider poisoning. *Arch. Intern. Med. 38*, 623-632.

9) CALVO R., CHIONETTI I. J., FASCIOLO J. C., BINIA A., PUEBLA M. M., ZANGHERI E. e FERNANDEZ F. (1957). Mecanismo de la accion presora del veneno de araña *Latrodectus mactans*. Rev. Soc. argent, Biol. *33*, 309-319.

10) CANTORE G. P. (1958). Contributo allo studio dell'azione farmacologica del veleno di *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi. *Riv. Parass. 19*, 158-160.

11) CANTORE G. P. e BETTINI S. (1958). Contributo allo studio dell'azione farmacologica del veleno di *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi. II. Azione sulla muscolatura bronchiale. *Riv. Parass.* 297-300.

12) CANTORE G. P. e BETTINI S. (1958). Contributo allo studio del veleno di *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi. *Rend. Ist. Sup. Sanità, 21*, 794 - 805.

13) CASTELLI A. (1913). Sulla tossicità delle punture del *Latrodectus tredecimguttatus* esistente in Sardegna. *Arch. Farm. Sper. Sci. Aff., 16*, 183 - 192.

14) CICARDO V. H. (1954). L'hypertension artérielle produite par le venin de *Latrodectus mactans. G. R. Soc. Biol. 148*, 1647 - 1648.

15) CONSTANT Y. e GOUÈRE P. (1948). Sur les phénomènes d'aranéisme provoqués par *Latrodectus menavody. Bull. Soc. Path. Exot. 41*, 234 - 237.

16) De Asis C. (1934). «Red Back» spider bite and magnesium sulphate treatment. A clinical study of four cases. *Amer. J. Trop. Med. 14*, 33 - 44.

17) Frank L. (1942). The black widow spider bite syndrome. *Mil. Surgeon, 91*, 329 - 336.

18) Gaddum J. H. (1955): Polipeptides, Livingstone Ltd, Edinburg and London.

19) Gajardo-Tobar R. (1951). La anatomia patologica del latrodectismo. *Bol. Infom. Paras. Chil. 6*, 20 - 21.

20) Gajardo-Tobar R. (1955). La especificidad de los sueros anti-aracnidos. *Bol. Chil. Paras. 10*, 2 - 4.

21) Gaud J. e Delasalle D. (1949). Aracnéisme dû aux morsures de *Latrodectus* au Maroc. *Bull. Inst. Hyg. Maroc, 9*, 232-237.

22) Gennari G. (1952). Sindrome addominale da morso di aracnide simulante l'ulcera gastrica o duodenale perforata. *Il Policlinico (Sez. Prat.) 59*, 1 - 9.

23) Giusti V. G. (1926). Il ragno rosso o falange Volterrana e la sua velenosità. *Rass. Volterr. 3*, 1 - 23.

24) Le Gac P. (1936). Accidents consécutifs à la pigure d'une araignée vémineuse, le *Latrodectus menavodi. Bull. Soc. Path. Exot. 29*, 621.

25) Kobert R. (1901). Beitrag zur Kenntnis der Giftspinnen. F. Enke, Stuttgart.

26) Maretic Z. e Stanic M. (1954). The health problem of arachnidism. *Bull. Org. Mond. Santé, 11*, 1007 - 1022.

27) Paganelli A. (1937). L'araneismo nella provincia di Roma. *Gazz. Intern. Med. Chir. 47*, 782 - 786.

28) Page I. H. in: Gaddum J. H. (1955). Polipeptides, Livingstone Ltd, Edinburg and London.

29) Pampiglione S. (1958). Il latrodectismo nella zona di Cerveteri. (1958). *Nuovi Ann. Ig. Microb. 9*, 1 - 11.

30) Prince Q. E. (1956). Arachnidism in children. *J. Pediatrics, 49*, 101 - 108.

31) Rindone G. (1947). Pseudoaddome acuto a tipo appendicolare conseguente a morso di aracnidi (casi clinici). *Gior Med. Mil.* (2) *marzo - aprile.*

32) Sampayo R. R. L. (1944). Pharmacological action of the venom of *Latrodectus mactans* and other *Latrodectus* spiders. *J. Pharm. Exp. Ther. 80*, 309 - 322.

32bis) Sampayo R. R. L. (1942). *Latrodectus mactans* y latrodectismo. Estudio experimental y clinico. El Ateneo, Buenos Aires.

33) Schenone H. F. (1953). Mordeduras de arañas. *Bol. Inform. Paras. Chil. 8*, 35 - 37.

34) Schenone H. F., Niedmann G., Bahamonde J. e Bonnefoy J. (1957). Algunas alteraciones cardiovascolares en el latrodectismo. *Bol. Chil. Paras., 12*, 29 - 30.

35) Shapiro H. A., Sapeike N. e Finlayson M. H. (1939). Pharmacological actions of the venom of *Latrodectus indistinctus. S. Afr. J. Med. Sci., 4*, 10 - 17.

36) Suarez J. R. E., Albaca E., Fasciolo J. C. (1952). Mecanismo de la acción hipertensora del veleno de la araña, «*Latrodectus mactans*». Cuarto Congreso Interamericano de Cardiologia, Buenos Aires, 507.

37) Taylor F. H. e Murray R. E. (1946). Spiders, ticks and mites. Including the species harmful to man in Australia and New Guinea. *Comm. Austr., Serv. Publ. n. 6.*

38) Thesing J. H. (1945). Black widow spider bite. *Cincinnati I. Med. 26*, 63 - 70.

39) Troise E. (1928). Action pharmacodynamique du venin de *Latrodectus mactans. C. R. Soc. Biol. 99*, 1431 - 1433.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XIX - N. 4 - Ottobre 1958

RECENSIONI

MARKELL E. K. & VOGE M.: *Diagnostic medical parasitology*, X + 276 pp., 115 figg. W. B. Sauders Company, Philadelphia & London 1958, doll. 7.00.

In stretta aderenza al titolo gli AA. si sono preoccupati di compilare un'opera che, basata sulla loro lunga esperienza nel campo della diagnostica parassitologica, potesse «servire di guida alla diagnosi di laboratorio e clinica in primo luogo delle malattie da protozoi ed elminti di importanza medica, e secondariamente a quella degli artropodi che hanno relazione con malattie». La loro opera è soprattutto dedicata agli Stati Uniti, ma poichè, come essi riconoscono, oggi non è più possibile, causa la frequenza d'uso e la velocità degli attuali mezzi di comunicazione, limitarsi alle sole specie indigene, il suo valore è praticamente cosmopolita.

Dopo un primo breve capitolo introduttivo, un secondo riassume, sinteticamente ma con grande chiarezza, gli elementi generali della parassitologia: dalla definizione dei diversi tipi di associazione tra animali di specie diversa, ai fenomeni di adattamento parassitario, alle azioni reciprocamente esercitate dal parassita e dall'ospite, alle generalità sui cicli biologici di protozoi ed elminti, alla definizione dei tipi e delle classi contenenti parassiti (con aggiunta per gli artropodi anche dei velenosi).

Il capitolo successivo si occupa con precisi dettagli dei procedimenti da seguire per un corretto esame parassitologico delle feci; per ogni particolare aspetto sono illustrati i metodi maggiormente usati, con l'indicazione della loro funzionalità ai fini dell'identificazione dei vari parassiti. Ad esso seguono due capitoli di parte speciale, dedicati cioè uno ai protozoi e l'altro agli elminti la cui diagnostica è appunto legata all'esame delle feci. Per ogni parassita, e lo stesso schema sarà seguito nei capitoli successivi, sono riferiti, con pressochè completa esclusione di ogni altra notizia, tutti quei dettagli di struttura, evidenti a fresco o dopo colorazione, nonchè i segni clinici quando presenti, che hanno effettiva importanza ai fini della diagnosi.

Ancora un capitolo illustra i procedimenti da seguire per l'esame di emoparassiti; ed è seguito da due altri, il primo dei quali dedicato alla malaria ed il secondo agli emoflagellati ed alle filarie. I tre capitoli seguenti trattano poi rispettivamente: dei parassiti dell'apparato genito-urinario; dei parassiti dei tessuti; degli artropodi, riguardati questi partitamente come parassiti, come trasmettitori di malattie e come agenti altrimenti dannosi.

Un capitolo, breve ma di sicuro interesse, si occupa degli pseudoparassiti e di quegli altri principali elementi che possono trarre in errore diagnostico l'osservatore inesperto. Gli ultimi due sono infine dedicati: il primo ai metodi diagnostici speciali, quali inoculazione in animali, biopsia e aspirazione, colture, metodi di concentrazione, intradermoreazioni, metodi sierologici e metodi del nastro di cellofan adesivo, della schiusura delle uova di schistosomi, del conteggio di uova di elminti nelle feci; il secondo ai fissativi, ai coloranti ed ai procedimenti di preparazione e conservazione di materiale parassitologico più pratici e comunemente usati.

Un elenco di 33 dati bibliografici relativi agli autori citati nel testo, ed un dettagliato indice analitico concludono infine il volume.

Aggiungeremo ancora che una ricca iconografia, in gran parte originale e, soprattutto per quanto riguarda i disegni, assai spesso veramente funzionale illustra degnamente quest'opera che certo, e meritatamente, incontrerà vivo favore tra medici e studenti di parassitologia. (Qualche inesattezza sfuggita agli AA. sarà certo corretta nelle successive edizioni; a pag. 100 si legge p. es. che *T. saginata* raggiunge *di solito* circa 12 metri di lunghezza).

Molto decorosa la veste editoriale.

M. Ricci

Starkoff O.: *Ixodoidea d'Italia. Studio monografico*, 384 pp., 60 figg., Ed. « Il Pensiero Scientifico », Roma, 1958, L. 4.500.

E' la prima monografia sulle zecche italiane. Vengono in essa descritte 24 specie di Ixodoidea, facenti parte della nostra fauna. La trattazione è preceduta da un interessante capitolo storico e da un glossario dei termini relativi alla morfologia esterna delle zecche; seguono le chiavi analitiche delle famiglie e dei generi. Altri due capitoli sono destinati alla morfologia generale e alla biologia. Segue poi la parte speciale, in ordine sistematico, in cui di ogni genere è fornita una chiave dicotomica per il riconoscimento delle singole specie e di ogni specie viene data una dettagliata descrizione e una elencazione di dati concernenti le località di cattura, gli ospiti noti, le sinonimie e ogni altra notizia utile. Questa parte, è quanto di più completo e accurato vi possa essere e non v'è autore che non sia stato consultato e analizzato.

Seguono poi alcuni capitoli che chiameremo riassuntivi, in cui le cognizioni fornite precedentemente vengono ricapitolate in maniera da fornire la possibilità di rapide informazioni circa la distribuzione, gli ospiti e la frequenza stagionale delle specie in esame.

Infine, vi è una carta geografica d'Italia, illustrante la distribuzione delle singole specie per regioni; un elenco delle denominazioni da sopprimere; un elenco bibliografico con circa 500 citazioni.

Molto notevole è il contributo personale dell'A. Infatti, 5 specie sono nuove per la fauna italiana, e non vi è nessuna delle rimanenti per la quale l'A. non abbia accresciuto notevolmente le nostre conoscenze con le sue osservazioni. Come è detto nell'introduzione, « mentre le indicazioni desunte da tutta la letteratura sono poco più di 200, le osservazioni personali ne forniscono circa 400 ».

E' qui opportuno osservare che su nessun altro gruppo di Artropodi di interesse medico o veterinario della nostra fauna esistono ancora lavori di questa portata: per avere notizie in proposito è infatti spesso necessario riferirsi alla letteratura straniera. Questo è quindi, per il nostro paese, il primo lavoro monografico del genere, e vogliamo augurarci che altri seguano al più presto l'esempio dello Starkoff, dandoci lavori analoghi per altri gruppi.

G. Saccà

Direttore responsabile: Dott. E. Mosna

Soc. An. Poligrafica Italiana Roma, Via della Guardiola, 22

INDICE DEL VOLUME XIX

1958

Riviste sintetiche e critiche:

Note e osservazioni: